

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVANDRO FREIRE TIRAPELLE

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS FASINAS E OUTRAS
PROTEÍNAS ASSOCIADAS AOS GRÂNULOS DE POLIHIDROXIBUTIRATO
EM *Herbaspirillum seropedicae*

CURITIBA

2012

EVANDRO FREIRE TIRAPELLE

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS FASINAS E OUTRAS
PROTEÍNAS ASSOCIADAS AOS GRÂNULOS DE POLIHIDROXIBUTIRATO
*EM *Herbaspirillum seropedicae**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências
(Bioquímica) pelo Programa de Pós graduação em
Ciências (Bioquímica) do Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Leda Satie Chubatsu

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

CURITIBA

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

EVANDRO FREIRE TIRAPELLE

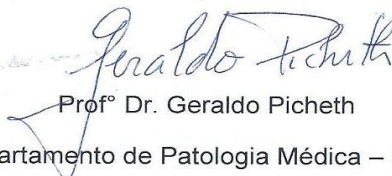
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS FASINAS E OUTRAS PROTEÍNAS
ASSOCIADAS AOS GRÂNULOS DE POLIHIDROXIBUTIRATO EM
Herbaspirillum seropedicae

Dissertação aprovada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica), pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profª Drª Leda Satie Chubatsu

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profº Dr. Geraldo Picheth

Departamento de Patologia Médica – UFPR



Dr. Doumit Camilios Neto

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 14 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Leda Satie Chubatsu, pela sua orientação, sugestões e disponibilidade.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos, por todo apoio, dedicação e amizade dispensados nesse período.

Agradeço aos demais professores do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio por todas as dicas e sugestões.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e seus funcionários pelo auxílio. Em especial à Dona Roseli Prado, ao Alex e ao Valter pela disponibilidade e atenção.

Aos amigos que fiz nesse grupo que sem o apoio deles não seria possível: Marco Antônio, Maria Isabel, Marco Aurélio, Bruno Aquino, Sarah Sacks, Cícero Silvano, que nesse período me “biologaram”.

Aos amigos do complexo 271/272: Luíza, Patrícia, Edileusa, Paloma, aos demais colegas de laboratório.

Aos meus pais, José e Vanda, e meus irmãos, Raffael e Thais, que sempre acreditaram em mim, na minha capacidade, sempre me deram forças nos momentos mais difíceis, mesmo sem compreender muito dessa vida dos DNAs e proteínas, a vocês reservo minha gratidão e amor eternos!

À minha namorada Juliane, que mesmo nos momentos mais irritantes e desgastantes de trabalho, sempre me apoiou com palavras de carinho e incentivo, amo você.

A CAPES, INCT- Fixação Biológica de Nitrogênio e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Sumário

Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS	14
1.2 BIOSÍNTESE DO POLÍMERO.....	15
1.3 PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO GRÂNULO DE PHB- FASINAS	19
1.4 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA FASINA.....	21
1.5 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3.1.1 Identificar proteínas associadas aos grânulos de PHB produzidos por <i>H. seropedicae</i> ;	26
3.1.2 Construir mutantes, a partir da estirpe SmR1 de <i>H.</i> <i>seropedicae</i> , por deleção dos genes <i>phaP1</i> e <i>phaP2</i> ;	26
3.1.3 Estudar a regulação da região promotora de <i>phaP1</i> e <i>phaP2</i> em <i>H. seropedicae</i> ;	26
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	27
4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	27
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	29
4.3 ANTIBIÓTICOS	29
4.4 MANIPULAÇÃO DO DNA.....	30
4.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	30
4.5.1 PREPARO DE CÉLULAS <i>E. coli</i> QUIMIOCOMPETENTES ..	30
4.5.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO.....	30
4.6 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO	31
4.7 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL.....	31
4.8 PURIFICAÇÃO DE DNA POR ADSORÇÃO EM SÍLICA.....	31

4.9	ELETROFORESE DE DNA	32
4.10	SEQUENCIAMENTO DE DNA	32
4.11	EXTRAÇÃO DOS GRÂNULOS DE PHB PARA IDENTIFICAÇÃO DE SUAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS	33
4.12	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	34
4.13	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS	34
4.14	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	34
4.14.1	PREPARO DA AMOSTRA	34
4.14.2	OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS ESPECTROS DE MASSA DOS PEPTÍDEOS TRÍPTICOS	35
4.15	CONSTRUÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H.</i> <i>seropedicae</i> nos genes <i>phaP1</i> , <i>phaP2</i> e <i>phbC1</i>	36
4.16	PROCEDIMENTO PARA SELEÇÃO DOS MUTANTES	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO GRÂNULO DE PHB...	37
5.2	CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS MUTANTES PARA FASINA PhaP1 (TP1) e PhaP2 (TP2)	48
5.3	ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES <i>phaP1</i> e <i>phaP2</i>	54
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7	CONCLUSÕES	60
8	REFERÊNCIAS	61

Lista de Figuras

Figura 1- VIA BIOSSINTÉTICA DE PRODUÇÃO DE PHB (STEINBÜCHEL <i>et al.</i> , 1992).	17
Figura 2- Modelo de iniciação <i>in vivo</i> da síntese do polímero. A) Modelo de Brotamento. B) Modelo Micelar	18
Figura 3- ESTRATÉGIA DE CONSTRUÇÃO DOS VETORES PARA DELEÇÃO DOS GENES <i>phaP1</i> e <i>phaP2</i> ..	37
Figura 4- GEL SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES ASSOCIADAS AO GRÂNULO DE PHB DE <i>H. seropedicae</i>	38
Figura 5- GEL SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO GRÂNULO DE PHB DE <i>H. seropedicae</i> ..	39
Figura 6- Modelo de regulação proposto para ação do PHB no Ciclo do Ácido Cítrico.....	47
Figura 7- PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR DAS REAÇÕES PARA CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> SMR1 NO GENE <i>phaP1</i>	49
Figura 8- PERFIL ELETROFORÉTICO DAS REAÇÕES DE PCR PARA CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> SMR1 NO GENE <i>phaP2</i>	50
Figura 9- PERFIL ELETROFORÉTICO DAS REAÇÕES DE PCR PARA CARACTERIZAÇÃO DOS DUPLOS MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> TP1 NO GENE <i>phaP2</i>	51
Figura 10- ELETROFORESE SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO GRANULO NA ESTIRPE SMR1 E MUTANTE <i>phaP1</i> (TP1)..	52
Figura 11- ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS FASINAS DE <i>H. seropedicae</i> e <i>R. eutropha</i> UTILIZANDO O MÉTODO NEIGHBOR-JOINING TREE.....	53
Figura 12- ALINHAMENTO DAS PROTEÍNAS PhaP1 E PhaP2 UTILIZANDO O PROGRAMA CLUSTALW.....	54
Figura 13- PERFIL ELETROFORÉTICO DAS REAÇÕES DE PCR PARA CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i> SMR1 NO GENE <i>phbC1</i>	55
Figura 14- ANÁLISE TRANSCRICIONAL DO GENE <i>phaP1</i> NA ESTIRPE SELVAGEM E TC1.....	56

Figura 15- ANÁLISE TRANSCRICIONAL DO GENE <i>phaP2</i> NA ESTIRPE SELVAGEM, TP1 E TC1.....	58
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1- MICRONUTRIENTES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE PHAS EM BACTÉRIAS (ADAPTADO DE BRANDL <i>et al.</i> , 1990).....	15
Tabela 2- GENES PRESENTES EM <i>H. seropedicae</i> SMR1 ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE PHB.	25
Tabela 3- LISTA DE ESTIRPES DE <i>E. coli</i>	27
Tabela 4- LISTA DE ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i>	27
Tabela 5- LISTA DE PLASMÍDEOS.....	27
Tabela 6- ANTIBIÓTICOS.....	30
Tabela 7- IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES IDENTIFICADAS ASSOCIADAS AOS GRÂNULOS DE PHB.....	42
Tabela 8- IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS ASSOCIADAS AOS GRÂNULOS DE PHB.....	43

Lista de Abreviaturas

D.O. = densidade óptica

EDTA = Ácido etilenodiamino-tetra-acético

PHB = polihidroxibutirato

DNA = ácido desoxirribonucleico

kb = quilopares de bases

kDa = quilodalton

kV = quilovolts

L = litro

MALDI = ionização dessorção a laser assistida por matriz

mL = mililitro

MM = massa molecular

MS = espectrometria de massas

m/v = massa/volume

m/z = razão massa carga

μL = microlitro

NADH = Nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido

NADP⁺ = Fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado

NADPH = Fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido

ns = nano segundos

ONPG = o-nitrofenil-β-D-galactosídeo

ORF = região codificadora de proteína

PAG = proteínas associadas ao grânulo

pb = Pares de base nucleotídeos

PCR = Reação em cadeia da polimerase

PHA = polihidroxialcanoato

rpm = rotações por minuto

SDS = Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil
sulfato de sódio

Tris = Tris(hidroximetil)-aminometano

v/v = volume/volume

x g = gravidade

RESUMO

O polihidroxibutirato é um polímero sintetizado por algumas bactérias quando em presença de grande aporte de carbono e deficiência de algum outro elemento essencial ao crescimento. É uma forma de reserva energética e é acumulado sob a forma de inclusões citoplasmáticas insolúveis. Sua síntese leva a associação de proteínas à sua estrutura, muitas envolvidas com a biossíntese e estrutura do grânulo. Das proteínas associadas ao grânulo a fasina é a mais abundante e tem um importante papel estrutural na manutenção da forma e tamanho dos grânulos. O presente trabalho teve por objetivo analisar as proteínas associadas aos grânulos de PHB de *H. seropedicae*, e também caracterizar as fasinas de *H. seropedicae*. Para análise das proteínas associadas aos grânulos, os mesmos foram extraídos da bactéria e suas proteínas associadas separadas por eletroforese e identificadas por espectrometria de massa. Dez proteínas consideradas as mais abundantes associadas aos grânulos de PHB foram identificadas: entre essas a fasina PhaP1, a regulatória PhbF e a PhbC sintase. Proteínas aparentemente não envolvidas com o metabolismo de PHB também foram identificadas como aconitase, leucil aminopeptidase, proteína tipo-histona e proteínas hipotéticas. A fim de verificar o papel das fasinas no metabolismo de PHB, mutantes para os genes *phaP1*, *phaP2* e *phbC1* foram construídos. Nossos resultados mostram que ambas fasinas têm a capacidade de se ligarem ao grânulo de PHB, e também que a expressão das mesmas só ocorre quando o PHB é sintetizado. No entanto, a expressão de PhaP2 só acontece na ausência de PhaP1 sugerindo diferenças na ativação da transcrição dos genes *phaP1* e *phaP2* por fatores ainda desconhecidos.

ABSTRACT

The polyhydroxybutyrate (PHB) is a polymer produced by some bacteria in both carbon excess and deficiency in other essential element. PHB works as an energetic reservoir and it is stored intracellularly in the form of granules. On the surface of PHB granules, some proteins are attached being important for the structure of the granules and metabolism of PHB. The phasin is the most abundant granule-associated protein and, it has an important structural role controlling the shape and size of granules. In this work, we present the identification of PHB granule-associated proteins from *Herbaspirillum seropedicae*, as well as the characterization of the phasins from this organism. In order to analyse the granule-associated proteins, PHB granules were extracted from bacterial culture and the proteins coating the granules were separated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and identified by mass spectrometry. The 10 more abundant proteins were identified. Among them, the phasin PhaP1, the regulatory protein PhbF and the PHB synthase, PhbC1. Proteins apparently not involved with PHB metabolism were also identified, like aconitase, histone-like protein, leucyl aminopetidase and hypothetical proteins. Aiming to verify the role of phasin in PHB metabolism, *phaP1*, *phaP2* and *phbC1* mutant strains were constructed. Our results showed that both phasins have the capability to bind PHB granule and also, the expression of them occurred only in PHB biosynthesis conditions. Interestingly, PhaP2 was only expressed when PhaP1 was absent, suggesting that the transcriptional regulation of *phaP2* might involve other unknown factors.

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos apresentam uma ampla versatilidade, são baratos, resistentes à corrosão, leves, apresentam alta durabilidade e possuem propriedades de isolamento térmico. Sua utilização está distribuída nas mais diferentes atividades industriais (ANDRADY e NEAL, 2009; REDDY, GHAI e KALIA, 2003). Esses polímeros sintéticos são obtidos através da polimerização de monômeros derivados do petróleo ou gás natural, adicionado de vários aditivos químicos. Noventa por cento dos plásticos encontrados em aterros sanitários, contém cloreto de polivinila (PVC) e poliestireno. Esses plásticos não podem ser degradados pela microbiota ambiental, devido à falta de aparato enzimático adequado (ATLAS e BARTHA, 1997). Devido a constante preocupação com os problemas ambientais causados pela produção e acúmulos de materiais plásticos de origem petroquímica, diversos países têm iniciado medidas para redução do lixo sólido, buscando a produção de materiais plásticos biodegradáveis, e a utilização de fontes renováveis de carbono. Esses materiais plásticos biodegradáveis devem possuir as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais e ainda serem completamente biodegradáveis quando descartados no meio ambiente (LEE, 1996)

Uma alternativa para substituir os polímeros sintéticos seria a utilização de polímeros termoelásticos tais como os polihidroxialcanoatos (PHA). Esses apresentam inúmeras vantagens sobre os polímeros petroquímicos: são biodegradáveis, biologicamente renováveis e conseqüentemente apresentam baixo impacto ambiental (STEINBÜCHEL e FUCHTENBUSCH, 1998), e devido a sua resistência à água, à radiação ultravioleta e a impermeabilidade ao oxigênio podem ser aplicado na produção de embalagens (GROTHER, MOO-YOUNG e CHISTI, 1999).

Os PHAs são polímeros acumulados por diversas bactérias sob forma de inclusões citoplasmáticas insolúveis. Esses compostos são produzidos em condições desbalanceadas de crescimento, ou seja, excesso de fonte de carbono e limitação de outro nutriente essencial para a multiplicação celular, servindo como reserva energética e carbono para a célula (ANDERSON e DAWES, 1990, SCHLEGEL, GOTTSCHALK e BARTHA, 1967).

1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

Os polihidroxicanoatos são biopolímeros não tóxicos, insolúveis em água, altamente cristalinos, com propriedades físicas e químicas semelhantes ao polipropileno (PP) (KADOURI *et al.*, 2005). São poliésteres muito versáteis produzidos por muitos microorganismos, apresentando um enorme potencial comercial, como um termoplástico biodegradável e biomaterial trazendo grande interesse à pesquisa e indústria. Os PHAs são produzidos tanto por bactérias gram positivas quanto gram negativas (PAGE e KNOSP, 1989; FORSYTH, HAYWARD e ROBERTS, 1958; OEDING e SCHLEGEL, 1973; LEVINE e WOLOCHOW, 1960; DOUDOROFF e STAINER, 1959; YORK *et al.*, 2001b; PÖTTER e STEINBÜCHEL, 2005; CATALÁN *et al.*, 2007).

A produção de PHAs foi inicialmente descrita em *Bacillus megaterium* por Lemoigne em 1926 sendo produzido em diferentes condições ambientais (MACRAE e WILKINSON, 1958). O PHA produzido pode variar de acordo com a fonte de carbono utilizada e o microorganismo produtor. Os mais comumente relatados são: PHB = poli(3-hidroxibutirato), P(3HV) = poli(3-hidroxivalerato), P(3HHx) = poli(3-hidroxihexanoato), P(3HO) = poli(3-hidroxioctanoato), P(3HD) = poli(3-hidroxidecanoato). Sendo o principal representante desse grupo o polihidroxibutirato (PHB) (CHOI e LEE, 1999; REDDY, GHAI e KHALIA, 2003).

O PHB é um homopolímero de D-(-)-3 hidroxibutirato, que estruturalmente apresenta um interior hidrofóbico, contendo proteínas imersas em sua superfície e apresentando um exterior hidrofílico. (DENNIS *et al.*, 2003; DENNIS *et al.*, 2008; MAYER e HOPPERT, 1997). Trata-se de um composto de estoque produzido por uma variedade de bactérias em resposta ao estresse nutricional. Em *Ralstonia eutropha* H16 e em *Acinetobacter beijerinckii* a síntese de PHB se dá em resposta a diversos tipos de limitações nutricionais incluindo: privação de oxigênio, nitrogênio, sulfato e magnésio e outras condições conforme descrito na Tabela 1 (CARTER e DAWES, 1979; DAWES e SENIOR, 1973; JACKSON e DAWES, 1976; OEDING e SCHLEGEL, 1973; REPASKE e REPASKE, 1976; SONNLEITNER *et al.*, 1979; WARD, ROWLEY e DAWES, 1977).

Sob condições ambientais limitantes, PHB constitui aproximadamente 80% do peso seco de células. Quando as condições limitantes são retiradas, a produção de

PHB diminui (DAWES e SENIOR, 1973). Essa característica se deve ao fato do PHB se comportar como um polímero de reserva energética análogo do glicogênio e amido (GRIEBEL, SMITH e MERRICK, 1968). Dessa maneira parte do carbono assimilado pela bactéria é acumulado sob forma de PHB e com a retirada do substrato ocorre imediata parada na produção do polímero e conseqüente degradação do mesmo (DOUDOROFF e STAINER, 1959). Porém sua formação não está somente relacionada à reserva energética, mas também ao NAD(P)H reoxidado para permitir ambos, a conversão de glicose em Acetil-CoA e a operação do ciclo de Krebs intensificando a produção de ATP, reduzindo equivalentes redutores e esqueletos carbônicos para biossíntese de outras biomoléculas. Sendo assim, a produção de PHB também é regulada pelo balanço NAD(P)H /NAD(P)⁺ devido alteração da atividade das enzimas envolvidas no catabolismo da glicose (ANDERSON e DAWES, 1990; BYROM, 1987; SENIOR e DAWES, 1971; SENIOR e DAWES, 1973; STEINBÜCHEL e SCHLEGEL, 1989).

Tabela 1- MICRONUTRIENTES ASSOCIADOS À PRODUÇÃO DE PHAS EM BACTÉRIAS (ADAPTADO DE BRANDL *et al.*, 1990).

Microorganismos	Nutriente Limitante
<i>Alcaligenes latus</i>	Amônio
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Oxigênio
<i>Azospirillum brasilense</i>	Amônio e oxigênio
<i>Pseudomonas sp.</i>	Amônio, ferro, magnésio, manganês e sulfato
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Amônio, sulfato, magnésio, e fosfato
<i>Rhodospirillum sphaeroides</i>	Amônio, fosfato e sulfato

1.2 BIOSÍNTESE DO POLÍMERO

Os PHAs podem ser obtidos por quatro métodos diferentes: i) produção biotecnológica (emprego de bactérias, fungos, leveduras ou até mesmo plantas transgênicas); ii) produção química; iii) combinação da produção química e

biotecnológica e iv) isolamento de fontes naturais (cutina de plantas) (STEINBÜCHEL e FUCHTENBUSCH, 1998).

O estudo da produção biotecnológica de PHAs tem se concentrado na compreensão a nível molecular das vias bioquímicas envolvidas na síntese. Todos os genes envolvidos na biossíntese de PHAs de diversas bactérias têm sido clonados e analisados. Em *Ralstonia eutropha*, os três genes responsáveis pela biossíntese estão organizados no operon, *phaCAB*, sendo que *phaA* codifica para uma cetotiolase, *phaB* uma acetoacetyl-CoA redutase NADPH-dependente e *phaC* para PHB sintase (STEINBÜCHEL, et al. 1992; REHM e STEINBÜCHEL, 1999; PÖTTER e STEINBÜCHEL, 2005 (2); PEOPLES e SINSKEY, 1989; SCHUBERT, STEINBÜCHEL e SCHELEGEL, 1988; SLATER, VOIGE e DENNIS, 1988, POHLMANN, FRICKE e REINECKE, 2006).

Além dos genes responsáveis pela biossíntese, outros que estão envolvidos no metabolismo de PHB também foram clonados e caracterizados tais como *phaP* (que codifica para a fasina, proteína mais abundante associada ao grânulo), *phaZ* (que codifica para a depolimerase, realiza mobilização do grânulo), *phaR* ou *phbF* (que codifica para a proteína regulatória). Proteínas estas que juntamente com as proteínas de biossíntese estão envolvidas de maneira direta na homeostase do grânulo, (STUBBE e TIAN, 2003).

Estudos bioquímicos revelaram duas diferentes vias para a síntese de PHB. 1) Na maioria dos microorganismos a via metabólica envolve 3 passos (Figura 1). O primeiro catalizado pela enzima β -cetotiolase, que condensa 2 acetil coenzima A (acetil-CoA) a acetoacetyl-CoA (NISHIMURA, SAITO e TOMITA, 1978). Este intermediário é reduzido a D-(-)- β -Hidroxibutiril-CoA pela acetoacetyl-CoA redutase dependente de NADPH. No último passo a PHB sintase cataliza a polimerização dos monômeros de 3-HB. 2) Em *Rhodospirillum rubrum* porém, o PHB é sintetizado através de uma via biossintética composta por 5 passos: uma acetoacetyl-CoA redutase dependente de NADH catalisa a formação de L-(+)- β -hidroxibutiril-CoA, que é convertido a D-(-)- β -Hidroxibutiril-CoA por duas enoil-CoA hidratases estereoespecíficas antes da polimerização (MOSKOWITZ e MERRICK, 1969).

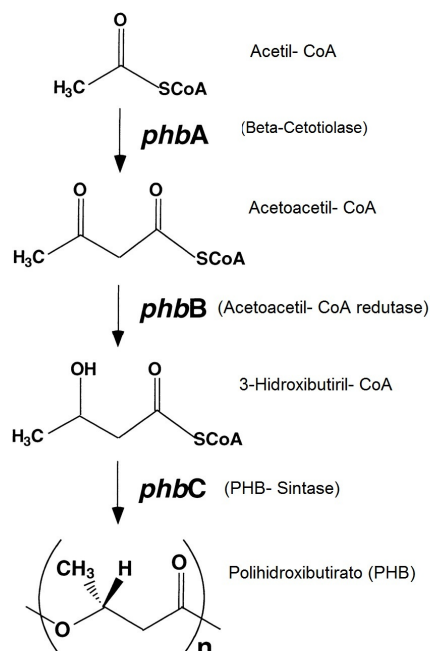


Figura 1- VIA BIOSINTÉTICA DE PRODUÇÃO DE PHB (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992).

Apesar das vias de produção de PHB serem conhecidas, o processo de início *in vivo* da síntese do polímero não está definido. Através de considerações teóricas são propostos dois modelos: modelo de brotamento e de formação de micela, conforme demonstrado na Figura 2. No modelo de formação micelar, a PHB sintase com ou sem o seu substrato está distribuída uniformemente pelo citoplasma e se agrega em estruturas tipo micelas. Essas iniciam a síntese do polímero insolúvel em água. A sintase remanescente liga-se à superfície da cadeia nascente de PHB para recobri-lo juntamente com as demais proteínas associadas, até que o polímero seja sintetizado. O outro modelo assume que a sintase está de alguma forma associada à membrana interna. A cadeia nascente de PHB produzida pela sintase é liberada entre as duas camadas da bicamada fosfolipídica, resultando na formação de PHB “revestido” por uma monocamada de fosfolípidos. O grânulo de PHB nascente é liberado no citoplasma, e as proteínas específicas (fasinas) são ligadas à sua superfície (STUBBE e TIAN, 2003).

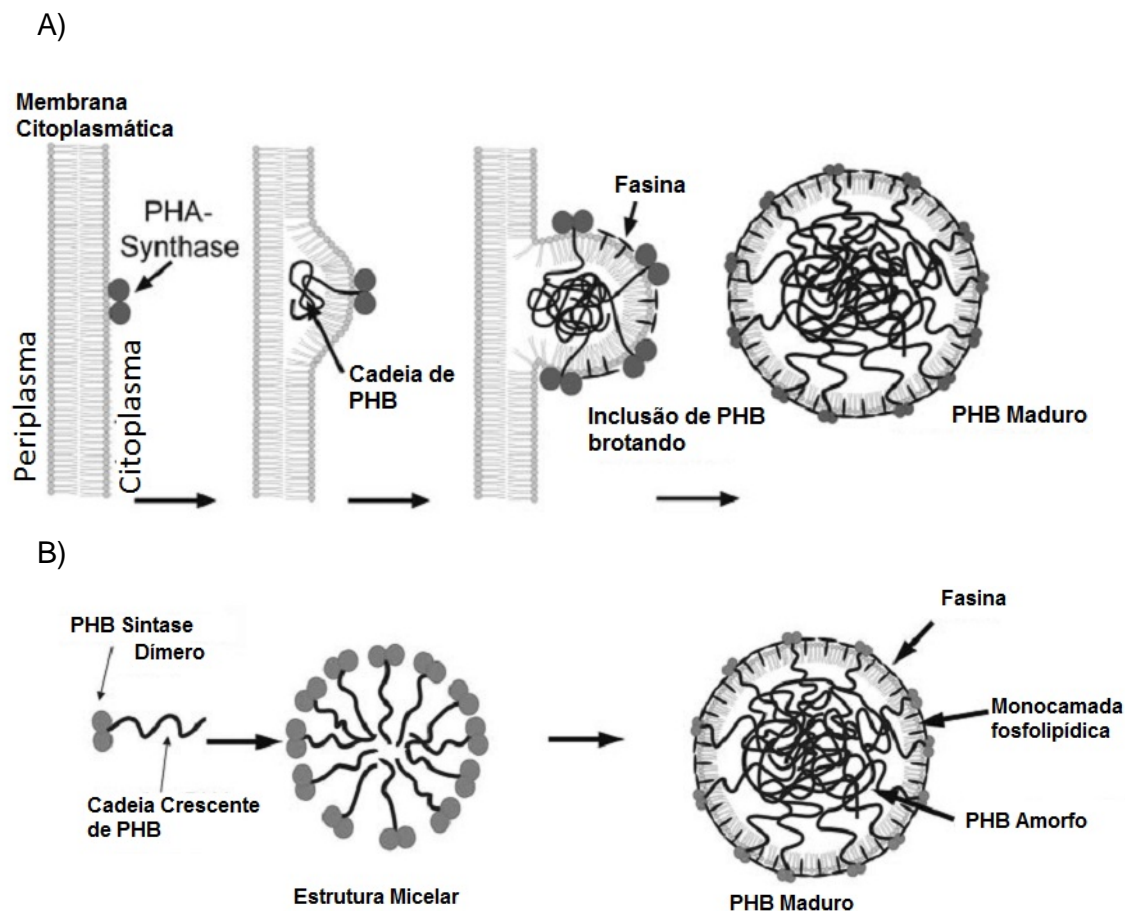


Figura 2- Modelo de iniciação *in vivo* da síntese do polímero. A) Modelo de Brotamento. B) Modelo Micelar

O modelo de micela assume que os grânulos devam estar aleatoriamente distribuídos no interior da célula no início da sua produção. Em contraste, o modelo de brotamento assume que os grânulos nascentes se concentrariam na periferia da célula, sendo esse último modelo demonstrado para *Rhodospirillum rubrum*, *R. eutropha*, *Escherichia coli* recombinante, *Xanthobacter autotrophicus* e *Caryophanon latum* onde os grânulos se encontravam distribuídos próximos aos pólos celulares (JENDROSSEK, 2005).

Uma investigação mais profunda foi realizada por Jendrossek e colaboradores (2007) em *C. latum*, através da utilização de microscopia de fluorescência confocal (LSFM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os resultados corroboram com aqueles obtidos anteriormente (JENDROSSEK, 2005), e permitem a complementação do modelo proposto por Stubbe e Tian (2003). Um complexo de

iniciação composto pela PHB sintase e outros componentes (fasinas) ligam-se a superfície da membrana citoplasmática interna ou a proteínas ligadas à membrana. Na presença do substrato (3-hidroxibutiril-coenzima A), os grânulos de PHB nascentes crescem rapidamente. Fasinas então ligam-se para aumentar a superfície do grânulo crescente, provavelmente por interações não covalentes. Interações similares poderiam ocorrer entre as fasinas e a membrana citoplasmática, levando a freqüente localização periférica dos grânulos nascentes observada. Durante o crescimento, os grânulos de PHB se destacam da membrana e se difundem para o citoplasma. Quando necessário, a célula reutiliza o PHB acumulado e as fasinas são desligadas da superfície do polímero.

1.3 PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO GRÂNULO DE PHB- FASINAS

Apesar do grânulo ser composto majoritariamente por 3-hidroxibutirato, já haviam indicações da presença de proteínas associadas à sua estrutura. Merrick e colaboradores, na década de 60, propuseram que proteínas envolvidas na polimerização e depolimerização do grânulo possivelmente estariam associadas à sua estrutura, sugerindo então que os grânulos seriam partículas subcelulares complexas que possuem fatores ligados que auxiliam na sua síntese e degradação (MERRICK e DOUDOROFF, 1964; MERRICK, 1965).

Análises químicas indicavam que os grânulos purificados apresentavam aproximadamente 2% de proteínas associadas à sua estrutura, e também pequenas quantidades de lipídeos. Sendo essas substâncias os constituintes da membrana que circundava o núcleo de PHB (LUDGREEN, PFISTER e MERRICK, 1964; GRIEBEL, SMITH e MERRICK, 1968; DAWES e SENIOR, 1973).

Estudos mais aprofundados foram realizados na busca da identificação das proteínas associadas ao grânulo através do isolamento dos grânulos por gradiente de sacarose ou glicerol e separação das proteínas em gel desnaturante. Esses trabalhos mostraram a presença de diversas proteínas, sendo que, muitas delas envolvidas na homeostase do grânulo como: fasinas, sintases, polimerases, depolimerases e uma proteína envolvida na regulação gênica (PhaR ou PhbF) (PIEPER- FURST e STEINBÜCHEL, 1992; MAEHARA, 1999; PIEPER-FURST *et al.*, 1994; FULLER *et al.*, 1992; WIECZOREK *et al.*, 1995).

STEINBÜCHEL e colaboradores (1992) propuseram uma classificação para as proteínas associadas ao grânulo, subdividindo-as em quatro classes: i) classe I compreende as PHA sintases, que catalizam a formação das ligações éster entre os componentes; ii) classe II compreende as PHA depolimerases, que são responsáveis pela degradação do PHA; iii) classe III compreende um novo tipo de proteína referida como fasina e que muito provavelmente funciona como um análogo de oleosinas em plantas discutidas à frente; iv) classe IV compreende todas as outras proteínas, que tem sido encontradas associadas ao grânulo e que não pertencem as demais classes (STEINBÜCHEL *et al.*, 1995; LIEBERGESELL *et al.*, 1992; HOROWITZ *et al.*, 1995; TESSMER *et al.*, 2007). Dentre essas, a proteína de maior abundância no grânulo é a fasina, sendo que ela apresenta um envolvimento estrutural com o grânulo (FULLER *et al.*, 1992; PIEPER-FURST *et al.*, 1994; WIECZOREK *et al.*, 1995; MAEHARA *et al.*, 1999).

A fasina foi inicialmente identificada em *Rhodococcus ruber* sendo a proteína predominantemente associada ao grânulo e que sua presença apresentava correlação positiva entre sua expressão e o conteúdo de PHB. A mesma apresenta um caráter anfipático contendo dois domínios hidrofóbicos, em C-terminal, possivelmente responsáveis pela interação com o polímero (PIEPER-FURST *et al.*, 1994; PIEPER-FURST *et al.*, 1995; MAEHARA *et al.*, 1999).

Essas proteínas parecem ter uma função similar as oleosinas em inclusões de triacilglicerol em sementes e pólen de plantas, formando uma camada na superfície dos grânulos como parte de uma interface entre o citoplasma hidrofílico e o núcleo hidrofóbico do grânulo (STEINBÜCHEL *et al.*, 1995). A presença de fasina também impede que outras proteínas que não estão relacionadas com o metabolismo do polímero liguem se ao mesmo impedindo a ligação inespecífica à superfície do grânulo. Essa ligação inespecífica pode causar efeitos deletérios à célula, como diminuição na taxa de crescimento (STEINBÜCHEL *et al.*, 1995; LIEBERGESELL *et al.*, 1992; HOROWITZ e SANDERS, 1995; TESSMER *et al.*, 2007). A ausência da fasina também influencia expressão de genes relacionados com a biossíntese e mobilização do PHB, porém, o mecanismo pelo qual isso ocorre permanece obscuro, já que não existe nenhum indicio de que a fasina possa se ligar ao DNA ou então interagir com proteínas tais como PHB polimerases ou depolimerases (WIECZOREK *et al.*, 1995; YORK *et al.*, 2001a; KUCHTA *et al.*, 2007).

Quando os genes que codificam para as diferentes fasinas são deletados ocorre uma alteração na morfologia e quantidade de grânulos da célula, pois, devido à falta das fasinas na superfície do grânulo ocorre o fenômeno de coalescência, que é a união dos mesmos formando um único grânulo maior que o usual, diminuindo a produção de grânulos (WIECZOREK *et al.*, 1995; PIEPER-FURST *et al.*, 1994; FULLER *et al.*, 1992; PIEPER-FURST *et al.*, 1995; MAEHARA *et al.*, 1999; KUCHTA *et al.*, 2007). Esse fenótipo está de acordo com o modelo proposto por Steinbüchel e colaboradores (STEINBÜCHEL *et al.*, 1995) que propõe que as fasinas estabilizam o PHA em uma emulsão de água e previne a coalescência do grânulo (WIECZOREK *et al.*, 1995). Em caso de superexpressão da fasina os grânulos se apresentam de tamanho muito reduzido quando comparados ao selvagem, tendo efeitos danosos para a célula (PIEPER-FURST *et al.*, 1994).

Através de estudos de predição de estruturas secundárias foi possível reconhecer que as fasinas de *Ralstonia sp.* provavelmente apresentem uma organização em α -hélice (cerca de 90%), sendo essa organização uma característica geral das fasinas (NEUMANN *et al.*, 2008). A sua capacidade de ligação ao grânulo não é determinada por um motivo conservado curto em nível de estrutura primária, mas, é provavelmente devido aos outros níveis estruturais (Neumann *et al.*, 2008). As fasinas são proteínas filogeneticamente distintas, porém, funcionalmente relacionadas sendo compostas por duas famílias (HANLEY *et al.*, 1999; WIECZOREK *et al.*, 1995; PIEPER-FURST *et al.*, 1994).

Análises de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) com a fasina de *R. eutropha* mostram que a fasina apenas se liga ao PHB quando um homotrímero com estrutura planar ou triangular é formado, onde a estabilidade do trímero de fasina é maior que o monômero da mesma. (NEUMANN *et al.*, 2008).

1.4 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA FASINA

Estudos em *R. eutropha* demonstraram que a expressão da fasina é elevada e independe da fonte de carbono utilizada (frutose, gluconato, 4-hidroxivalerato, laevulinato, octanoato e succinato), porém quando a bactéria é cultivada em condições não permissivas à produção de PHB a fasina não é expressa. Logo, a expressão da mesma é acoplada à produção de PHB, sendo a quantidade de fasina

paralela à quantidade de PHB sintetizado (WIECZOREK *et al.*, 1995; YORK *et al.*, 2001b).

Esse acoplamento da expressão de fasina e produção de PHB foi esclarecido após descoberta da proteína regulatória PhaR (PÖTTER *et al.*, 2005). Trata-se de um regulador negativo da expressão das fasinas e outros genes relacionados ao metabolismo de PHB. Esta proteína encontra-se ligada à região promotora dos seus genes alvos bloqueando sua expressão (MAEHARA *et al.*, 1999; PÖTTER *et al.*, 2002; PIETRO *et al.*, 1999; MAEHARA *et al.*, 2001; PÖTTER *et al.*, 2002; CHOW e YANG, 2010). Em 2002, York e colaboradores, através da utilização de mutantes, $\Delta phaR$, demonstraram que PhaR liga-se a sequência regulatória da fasina e bloqueia a transcrição de *phaP*. O acoplamento da síntese de PhaP e produção de PHB ocorre no início da produção do polímero, PhaR é removida da sequência regulatória de *phaP*, através de ligação com o grânulo de PHB. A partir daí a expressão de PhaP é tão intensa quanto o grau de retirada de PhaR e da disponibilidade de nutrientes, sendo posteriormente reprimida após a parada e degradação do grânulo e liberação da proteína PhaR para o citoplasma (YORK *et al.*, 2002).

A superfície do grânulo é suficientemente grande para que pequenas quantidades de PhaR possam se ligar, contudo PhaP deve apresentar maior afinidade pelos grânulos para que ela possa se ligar ao PHB juntamente com as demais proteínas impedindo a ligação de PhaR. Além disso já havia sido demonstrado que a fasina é dificilmente encontrada como uma proteína solúvel no citoplasma (WIECZOREK *et al.*, 1995). Com isso em fases tardias do acúmulo de PHB excessos da proteína PhaR podem se ligar novamente da região regulatória de *phaP*, prevenindo a formação de PhaP mais do que pode ser ligado aos grânulos (PÖTTER *et al.*, 2002).

Posteriormente foi demonstrado que PhaR possui dois domínios: um de ligação ao DNA e outro ao PHB. A ligação de PhaR ao grânulo é de alta afinidade porém, de baixa especificidade (interações hidrofóbicas) enquanto a ligação ao DNA é relativamente específica (YAMASHITA *et al.*, 2006; YAMADA *et al.*, 2007). Geralmente, a ligação de uma molécula efetora a sua proteína correspondente resulta em uma mudança conformacional que inibe ou previne a ligação ao DNA, resultando em uma desrepressão transcricional do regulon (FRANCO *et al.*, 2006).

Porém, dados de QCM (microbalança de cristal de quartzo), técnica que permite avaliar a interação de proteínas com o PHB, demonstraram que, PhaR representa um caso raro porque seu seqüestro pelo grânulo leva a uma insignificante mudança conformacional, considerando o complexo temporário formado por: PhaR, DNA-alvo e PHB. Esses estudos indicaram que os resíduos de Lys posição 13 e Arg posição 18 possivelmente correspondem aos aminoácidos básicos que interagem com os fosfatos do DNA. Além disso, resíduo de Tyr ocupam motivos de ligação ao DNA de muitos fatores de transcrição contribuindo para o empilhamento de interações com os anéis das bases de DNA. Uma Tyr na posição 15 da PhaR de *R. eutropha* poderia fazer parte desse empilhamento da ligação de PhaR ao DNA alvo (YAMADA *et al.*, 2007).

1.5 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica, gram-negativa, geralmente vibróide, com dois flagelos em um ou em ambos os pólos. Inicialmente, foi incluído no gênero *Azospirillum* devido à morfologia e fisiologia semelhantes às bactérias deste gênero (BALDANI *et al.*, 1984). No entanto, estudos posteriores de homologia de DNA mostraram evidências que motivaram a proposta da criação de um novo gênero, o *Herbaspirillum*, pertencente ao sub-grupo β das proteobactérias (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1996). Segundo a etimologia das palavras: *Herbaspirillum* corresponde a uma pequena bactéria em formato espiral presente em sementes de plantas herbáceas e *seropedicae* refere-se à cidade de Seropédica/Rio de Janeiro/Brasil, onde o organismo foi primeiramente isolado (BALDANI *et al.*, 1986).

A colonização e os benefícios da interação entre espécies do gênero *Herbaspirillum* e o arroz foram estudados em alguns trabalhos (JAMES *et al.*, 2002). Quando variedades de arroz tolerantes a alumínio foram colonizadas pela estirpe de *H. seropedicae* Z67 ocorreu o aumento do crescimento e acúmulo de nitrogênio nessas plantas (GYANESHWAR *et al.*, 2002). Outros estudos mostraram que a estirpe de *H. seropedicae* (LR15) inoculada em arroz foi capaz de colonizar a superfície das raízes e os tecidos internos, além de estimular o crescimento das raízes dessas plantas e através da produção de fitohormônios (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003; SCHWAB, 2006).

Além do seu potencial como fixadora de nitrogênio em gramíneas ele também foi descrito como produtor de PHA (CATALÁN *et al.*, 2007). Os resultados demonstram que *H. seropedicae* cepa Z69 foi capaz de produzir PHB em meio contendo glucose como fonte de carbono e em baixas concentrações de nitrogênio (5 mmol/L). Além disso, com a adição de ácido nonanóico, a bactéria foi capaz de produzir um copolímero de PHB com polihidroxivalerato (PHV) (CATALÁN *et al.* 2007), a incorporação de unidade de 3-hidróxi-valerato gera um copolímero com maior flexibilidade e com uma variedade de aplicações mais ampla (HOLMES, 1985).

Resultados obtidos no nosso laboratório com a estirpe SmR1 de *H. seropedicae* mostraram que a bactéria é capaz de produzir PHB até 50% do seu peso seco quando cultivada com malato (37 mmol/L) e NH₄Cl (20 mmol/L). Uma análise da composição do polímero por cromatografia gasosa mostrou que este é formado exclusivamente por ácido 3-hidróxi-butírico.

Com relação à fasina, o genoma de *H. seropedicae* apresenta duas cópias do gene sendo: *phaP1* e *phaP2*. Isso está em conformidade ao relatado em diversos microorganismos nos quais a fasina apresenta vários homólogos (PÖTTER *et al.*, 2004). Chaves e colaboradores (2008) identificaram a presença da fasina, PhaP1, em géis bidimensionais, de proteínas totais de *H. seropedicae*, relatando-a como uma proteína de alto nível de expressão em condições de fixação de nitrogênio, representando quase 4% das proteínas totais identificadas. Também foram identificadas beta-cetotiolase, acetoacetil- CoA redutase (2,6% das proteínas totais) e a proteína regulatória (PhbF). Esses altos níveis de expressão da fasina e a identificação da maioria das enzimas envolvidas na via de biossíntese de PHB sugerem que haja uma grande quantidade de grânulos nas células (CHAVES, 2008). Além disso, resultados de Kadowaki e colaboradores (2011), apontam que a expressão do gene da fasina e de outros envolvidos na biossíntese e degradação do grânulo sofrem ampla regulação por PhbF, seguindo o mesmo modelo proposto por York e colaboradores (2002) no qual PhbF se comporta como um regulador negativo, que pode ser seqüestrado para o polímero liberando a expressão dos seus genes alvos.

A Tabela 2 descreve todos os genes envolvidos na biossíntese do PHB e que foram anotados no seqüenciamento genômico de *H. seropedicae* (PEDROSA *et al.*, 2011; Número de acesso GenBank NC_014323.1).

Tabela 2- GENES PRESENTES EM *H. seropedicae* SMR1 ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE PHB.

Gene	Função	Identificação ORF	Identificação GenBank
<i>phbA1</i>	Provável acetil-CoA aciltransferase	Hsero_0256	9400857
<i>phbA2</i>	Provável acetil-CoA aciltransferase	Hsero_0239	9400840
<i>phbC1</i>	Provável PHB sintase	Hsero_2999	9403600
<i>phbC2</i>	Provável PHB sintase	Hsero_2405	9403006
<i>phbF</i>	Proteína regulatória do acúmulo de PHB	Hsero_2997	9403598
<i>phaC1</i>	PHA sintase	Hsero_0265	9400866
<i>phaC2</i>	PHA sintase	Hsero_2625	9403226
<i>phaB</i>	Provável 3-cetoacil-CoA redutase	Hsero_2998	9403599
<i>phaZ1</i>	PHA depolimerase	Hsero_1622	9402223
<i>phaZ2</i>	PHA depolimerase	Hsero_0639	9401240
<i>phaP1</i>	Provável proteína da família fasina	Hsero_1639	9402240
<i>phaP2</i>	Provável proteína da família fasina	Hsero_4759	9405360

2 JUSTIFICATIVA

Levando-se em consideração que *H. seropedicae* desponta como um potencial produtor de PHB e que este metabolismo ainda não foi plenamente caracterizado neste diazotrofo, este projeto teve como objetivos identificar as proteínas associadas ao grânulo de PHB e caracterizar funcionalmente as fasinas.

3 OBJETIVOS

Identificar as proteínas associadas ao grânulo de PHB em *Herbaspirillum seropedicae* estirpe SmR1 e caracterizar funcionalmente as fasinas, determinando seu envolvimento na biossíntese dos grânulos de PHB.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1.1 Identificar proteínas associadas aos grânulos de PHB produzidos por *H. seropedicae*;
- 3.1.2 Construir mutantes, a partir da estirpe SmR1 de *H. seropedicae*, por deleção dos genes *phaP1* e *phaP2*;
- 3.1.3 Estudar a regulação da região promotora de *phaP1* e *phaP2* em *H. seropedicae*;

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de *Escherichia coli* que foram utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3- LISTA DE ESTIRPES DE *E. coli*

Estirpe	Características	Referência
TOP 10	hsdR, mcrA, lacZΔM15, recA	INVITROGEN
S17.1	Sm ^R , Tra ⁺	SIMON <i>et al.</i> , 1983

As estirpes de *H. seropedicae* que foram utilizadas estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4- LISTA DE ESTIRPES DE *H. seropedicae*

Estirpe	Características	Referência
SmR1	Estirpe parental, SmR1, Nif+	SOUZA <i>et al.</i> , 2000
TP1	SMR1 contendo uma deleção de 647 bases do gene <i>phaP1</i>	Este trabalho
TP2	SMR1 contendo uma deleção de 490 bases do gene e <i>phaP2</i>	Este trabalho
TP1P2	SMR1 contendo uma deleção de 647 bases do gene <i>phaP1</i> e 490 bases do gene <i>phaP2</i>	Este trabalho
TC1	SMR1 contendo deleção total do gene <i>phbC1</i>	Este trabalho

Os plasmídeos que foram utilizados estão listados na Tabela 5.

Tabela 5- LISTA DE PLASMÍDEOS

Plasmídeo	Características	Referência
pTZ57R/T	Amp ^R , 3'-T p/ ligação de fragmentos de DNA amplificados pela <i>Taq</i> DNA Polimerase	FERMENTAS

pK18mobsacB	Km ^R , Suc ^S , <i>lacZ'</i> ; vetor mobilizável	SCHAFFER <i>et al.</i> , 1994
pMP220	Tc ^R , vetor fusão transcricional com gene <i>lacZ</i> , com sítio policlonagem do pPW452 invertido	SPAINK <i>et al.</i> , 1987
pTZP1UP	Contém aproximadamente 467 pb da região a montante do gene <i>phaP1</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZP1DW	Contém aproximadamente 345 pb da região a montante do gene <i>phaP1</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZP2UP	Contém aproximadamente 255 pb da região a montante do gene <i>phaP2</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZP2DW	Contém aproximadamente 276 pb da região a montante do gene <i>phaP2</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZPP2	Contém a região promotora do gene <i>phaP2</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZC1UP	Contém aproximadamente 370 pb da região a montante do gene <i>phbC1</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZC1DW	Contém aproximadamente 370 pb da região a jusante do gene <i>phbC1</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZP1DEL	Contém o fragmento Sal I e Kpn I do vetor pTZP1UP e ligado ao fragmento BamH I e Kpn I do vetor pTZP1DW, linearizado com as enzimas Sal I e BamH I	Este trabalho
pTZP2DEL	Contém o fragmento BamH I e Kpn I do vetor pTZP2UP e ligado ao fragmento Sal I e Kpn I do vetor pTZP2DW, linearizado com as enzimas Sal e BamH I	Este trabalho
pTZC1DEL	Contém o fragmento Sal I e Kpn I do vetor pTZC1UP e ligado ao fragmento BamH I e Kpn I do vetor pTZC1DW, linearizado com as enzimas Sal I e BamH I	Este trabalho
pK18P1DEL	Contém fragmento Sal I e BamH I do vetor pTZP1DEL ligado ao pK18mobsacB linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho

pK18P2DEL	Contém fragmento Sal I e BamH I do vetor pTZP2DEL ligado ao pK18mobsacB linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
pK18C1DEL	Contém fragmento Sal I e BamH I do vetor pTZC1DEL ligado ao pK18mobsacB linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
ProP2lacZ	Contém o fragmento Pst I e Bgl II do vetor pTZPP2 ligado ao pMP220 linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho

4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFb-malato (PEDROSA e YATES, 1984) a 30°C, sob agitação de 120 rpm. As culturas em meio sólido ou semi-sólido foram crescidas em NFb-malato sem agitação e incubadas em estufa a 30°C.

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH₄Cl (cloreto de amônio) 20 mmol/L. As soluções de fosfato (159,4 g/L de KH₂PO₄ e 17,8 g/L de K₂HPO₄), cloreto de amônio e de glutamato foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio no momento de uso. Quando completo, o meio de cultura apresentava pH 6,8, e passou a ser denominado NFbHPN. O meio NFbHPN sólido foi obtido adicionando-se ágar (15g/L) ao meio líquido.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB), Terrific broth (TB), SOC ou SOB (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989) sob agitação de 150 rpm ou em meio sólido LA, a 37°C.

Para a obtenção do meio LA, usado para cultivo em meio sólido, adicionou-se 15 g/L de ágar ao meio LB.

4.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos foram adicionados ao meio, de acordo com a resistência da estirpe ou conferida pelo vetor transformado. As soluções de antibióticos foram preparadas segundo Sambrook *et al*, 1989, e mantidas a 4°C.

Tabela 6- ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Concentração final (µg/mL)
Ácido Nalidíxico	5 ^b
Ampicilina	250 ^a
Canamicina	100 ^a , 500 ^b
Cloranfenicol	30 ^a , 150 ^b
Estreptomicina	20 ^a , 80 ^b
Tetraciclina	10 ^{a,b}

^a *Escherichia coli*^b *Herbaspirillum seropedicae*

4.4 MANIPULAÇÃO DO DNA

Todas as reações de ligação, restrição e PCR foram realizadas nas condições específicas para a atividade ótima de cada enzima, de acordo com orientação do fabricante (Fermentas®, Invitrogen®, New England Biolabs®, Promega®).

4.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

4.5.1 PREPARO DE CÉLULAS *E. coli* QUIMIOCOMPETENTES

Cinquenta microlitros de uma cultura saturada de *E. coli* foram inoculadas em 5 mL de meio LB. A cultura foi crescida até uma D.O.₆₀₀ de \cong 0,2-0,5. Foram aliqotados em microtubos e centrifugados (2.500 x g por 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi removido e ressuspenso em 100 µL de solução TSS por mL de cultura (LB contendo 10% (m/v) polietileno glicol, 5% (v/v) dimetil sulfóxido e 50 mM MgCl₂ em pH 6,5 gelado).

4.5.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

As células ressuspenso em TSS foram mantidas no gelo e foi adicionado 10 µL de DNA (ligação ou plasmídeo integral). As células e o DNA ficaram em gelo por aproximadamente 30 minutos. Passado o tempo foram incubados por 30 segundos a 42°C e colocados imediatamente em gelo por 2 minutos. Após o choque térmico as células foram recuperadas em 1 mL de SOC por aproximadamente 1 hora a 37°C e plaqueadas nos meios contendo os antibióticos adequados.

4.6 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR CONJUGAÇÃO

Os plasmídeos a serem transferidos para as estirpes de *H. seropedicae* foram mantidos em *E. coli* S17.1 (tra+). As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas nos meios NFbHPN-malato e LB, respectivamente, na ausência de antibióticos, até uma D.O.600 de aproximadamente 0,7. Em seguida, foram misturados 50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 5 µL da cultura de *E. coli* e as células foram plaqueadas como uma gota em meio LA/NFbHPN-malato (1:3) e incubadas a 30 °C durante 20 horas. A massa de células foi raspada, suspensa em 1 mL de NFb-malato e plaqueada em meio NFbHP-malato acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl contendo os antibióticos adequados.

4.7 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

O isolamento de plasmídeos de *E. coli* baseou-se no método da lise alcalina descrito por Sambrook e colaboradores (1989), com modificações.

A bactéria *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foi crescida em 5 mL de meio LB adicionado dos antibióticos adequados até uma D.O.600 \cong 1,5. A cultura foi transferida para tubos plásticos de 1,5 mL e as células foram coletadas por centrifugação (13.000 x g, 1 minuto) e ressuspensas em 150 µL de uma solução contendo Tris.HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glucose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L (GET) gelada. Procedeu-se a lise celular através da adição de 200 µL de uma solução contendo NaOH 0,2 mol/L e SDS 1% (m/v) (solução de lise). Proteínas, DNA cromossômico, restos celulares e o SDS foram precipitados pela adição de 200 µL de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e incubação por 10 minutos em gelo. As amostras foram, então, centrifugadas (13.000 x g, 5 minutos) e a solução aquosa foi extraída com 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA plasmidial foi precipitado com 1mL de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco a vácuo e dissolvido em 30 µL de água estéril. O DNA purificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

4.8 PURIFICAÇÃO DE DNA POR ADSORÇÃO EM SÍLICA

Esse protocolo se baseia na capacidade de ligação do DNA à sílica na presença de altas concentrações de sal, no caso Hidrocloreto de Guanidina 6 mol/L.

Apresenta uma alta eficiência de recuperação (90%) e é aplicável para molécula de DNA de vários tamanhos.

Para recuperação de DNA em gel de agarose, após a separação eletroforética, foi cortada a banda que contém o fragmento de DNA desejado. Após determinado o volume do gel (1g igual a 1mL), foi adicionado pelo menos 3 volumes de hidrócloro de guanidina 6M (concentração final deve estar no mínimo 4M). Procedeu-se incubação por 10 minutos para que o gel fosse dissolvido. Foi adicionada uma suspensão de sílica 50% (Sigma S-5631) e incubado 5 minutos a 57°C (para adsorção do DNA à sílica). Após incubação o material foi centrifugado (10.000 rpm centrífuga Minispin) por 15 segundos para formação do pelete. Então procedeu-se a lavagem do pelete com 500µL de solução de lavagem (etanol 70% ou 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 50% etanol), por 2 a 3 vezes. Após a última lavagem, o material foi centrifugado e todo o líquido foi removido usando uma pipeta. O precipitado foi seco, para a remoção do etanol. O DNA adsorvido à sílica foi eluído em tampão TE (10 mM Tris·Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA) ou água usando no mínimo duas vezes o volume inicial de sílica utilizado e incubado a 57°C por 5 minutos.

No caso de purificação de produtos de PCR o protocolo foi idêntico, mediu-se o volume da reação de PCR e adicionaram-se três volumes de hidrócloro de guanidina, as centrifugações e lavagens foram realizadas como anteriormente descrito.

4.9 ELETROFORESE DE DNA

A eletroforese de DNA foi feita em gel de ágar ou agarose horizontal como descrito por Sambrook e colaboradores (1989). O tampão utilizado foi TBE 1X (Tris-borato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,3). O DNA foi visualizado após tratamento com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador EC3 System - UVP BioImaging Systems.

4.10 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para confirmação da sequência dos fragmentos clonados, foi realizado seqüenciamento dos plasmídeos. O seqüenciamento foi baseado na metodologia desenvolvida por Sanger e colaboradores (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977) empregando a incorporação de dideoxinucleotídeos marcados com fluoróforos.

Foram utilizados aproximadamente 0,5 µg do DNA plasmidial purificado, 2 pmols do oligonucleotídeo iniciador apropriado e 3,0 µL de mistura para sequenciamento Sequencing Reagent Premix (DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences). O volume final da reação foi de 8 µL. As reações foram feitas utilizando-se um termociclador e os parâmetros foram: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C e 30 ciclos de 20 segundos a 94 °C e 1,5 minutos a 60°C. O produto do seqüenciamento foi precipitado com etanol 100% centrifugado, lavado o precipitado com etanol 80%. Foi então, dissolvido em 4 µL de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems), desnaturado por 2 minutos a 96°C e submetido à eletroforese em um sequenciador automático de DNA da ABI-PRISM 377 (Applied Biosystems).

4.11 EXTRAÇÃO DOS GRÂNULOS DE PHB PARA IDENTIFICAÇÃO DE SUAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS

Para extração dos grânulos, um inóculo de *H. seropedicae* foi feito em meio NFb-malato HPN. A cultura (490 mL) foi centrifugada a 4000 x g, por 10 minutos a 4°C. O sedimento de células foi ressuspensão em 20 mL de tampão fosfato de potássio (KP) (100 mM, pH 7.5) e lisado por sonicação em 9 ciclos de 30 segundos ligado/desligado em potência 20%. O lisado foi centrifugado 4000 x g por 10 minutos e ressuspensão novamente em 10 mL de tampão KP. A amostra foi colocada sobre o primeiro gradiente (8 mL de glicerol 50% e 2 mL de glicerol 90%). Foi realizada a ultracentrifugação em centrífuga Hitachi modelo Himac CP 90 Beta, 210.000 x g rotor de ângulo fixo a 4°C, por 2 horas. Terminado o tempo a camada que estava sob o glicerol 90% foi removida e transferida para um novo tubo. Foram adicionados 50 mL de tampão KP e se realizou a lavagem. Posteriormente foi centrifugado 30.000 x g por 10 minutos e ressuspensão o precipitado formado em 5 mL de KP. Então foi depositado os 5 mL sob o segundo gradiente (2 mL de glicerol 50%, 2 mL de glicerol 60%, 2 mL de glicerol 80% e 2 mL de glicerol 90%), se procedeu nova ultracentrifugação conforme descrito anteriormente. O material sob o glicerol 90% foi removido e lavado por duas a três vezes, centrifugado 14.000 x g por 20 minutos e ressuspensão em 800 µL de glicerol 50% e estocados a -40°C.

4.12 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Todas as quantificações de proteínas foram realizadas conforme método descrito por Bradford (1976). A curva padrão foi feita utilizando albumina de soro bovino, preparada no mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas.

4.13 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

As eletroforeses de proteínas foram realizadas em gel de poliacrilamida desnaturante conforme protocolo descrito por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel separador com uma concentração que variou de 7,5% (m/v) a 12% (m/v) de poliacrilamida e gel de empilhamento a 4% (m/v) de poliacrilamida. Foi utilizado sistema vertical para as eletroforeses, segundo as orientações do fabricante (Hoefer®). As amostras foram tratadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β -mercaptoetanol) e fervidas antes da aplicação para total desnaturação protéica. A voltagem da corrida utilizada foi de 150V, utilizando o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1 g/L de SDS). Terminada a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Coomassie Blue R-250.

4.14 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.14.1 PREPARO DA AMOSTRA

Proteínas foram retiradas do gel manualmente utilizando um bisturi ou ponteiras novas estéreis e colocadas em tubos tipo eppendorf. A descoloração dos géis foi feita utilizando 200 μ L de uma solução composta por 75 mmol/L bicarbonato de amônio em 50% de acetonitrila, este procedimento foi repetido até descoloração completa dos géis. Em seguida, o fragmento de gel foi desidratado com 100 μ L de acetonitrila 100% por 5 minutos, procedimento realizado duas vezes, e seco em fluxo laminar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Os fragmentos foram hidratados com 10 μ L de uma solução contendo 10 ng/mL de tripsina em tampão bicarbonato de amônio 40 mmol/L pH 8,0 contendo 10% acetonitrila em gelo por 1 hora. Após completa rehidratação, as amostras foram retiradas do gelo e foram adicionadas de mais 10 μ L de tampão bicarbonato de

amônio 40 mmol/L pH 8,0 contendo 10% acetonitrila e as amostras permaneceram em estufa a 37°C por um período de 16 a 24 horas. Após incubação das amostras 1 µL da amostra foi misturada a 1 µL de solução 50% acetonitrila, 0,1% ácido trifluoracético saturada com matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico), depositadas em placas para análise no espectrômetro de massa.

4.14.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS ESPECTROS DE MASSA DOS PEPTÍDEOS TRÍPTICOS

As massas dos peptídeos trípticos foram determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-ToF/ToF/MS modelo Autoflex II (Bruker Daltonics). O programa de computador utilizado foi FlexControl 2.0 (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 ns entre o pulso de laser e aplicação da voltagem, e faixa de aquisição entre 800 – 3200 m/z. A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (angiotensina, substância P, bombesina, ACTH e somatostatina) e como calibrante interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50 Da e 2211,10 Da) quando presentes. A análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando o programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics).

Dados de fragmentação de peptídeos (espectro MS/MS) foram obtidos utilizando um Espectrômetro de massa MALDI-ToF/ToF/MS/MS tipo Autoflex II (Bruker Daltonics). O programa de computador utilizado foi o FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics). O espectro MS foi obtido utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente e o espectro MS/MS foi obtido utilizando os parâmetros especificados pelo método LIFT do programa FlexControl v.3.0.

Para identificação das proteínas, foi utilizado o programa MASCOT, instalado localmente e o banco de dados completo de proteínas anotadas a partir da sequência do genoma de *H. seropedicae*. Os parâmetros de busca utilizados no programa MASCOT foram os seguintes: enzima tripsina, nenhum sítio de clivagem perdido, oxidação de metionina como modificação variável. O erro máximo permitido no valor de m/z foi de 100 ppm. Picos de tripsina e queratina foram excluídos previamente à busca. A identificação foi considerada positiva quando o “Score” da candidata foi superior a 50.

4.15 CONSTRUÇÃO DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae* nos genes *phaP1*, *phaP2* e *phbC1*

Para construção dos mutantes *phaP1* e *phaP2* foram construídos dois pares de iniciadores: um par de “primers” abrange a região a montante do gene e o seu início (fragmento UP) e o outro par de primers abrangendo o fim do gene e a jusante do códon de terminação (fragmento DW). Dessa maneira o amplicon flanqueia o gene que se deseja deletar. Posteriormente foi realizada restrição destes fragmentos, que continham em suas pontas sítios de restrição KpnI e ligados entre si. O produto dessa ligação foi amplificado e clonado em vetor pK18mobsacB. Através da restrição do fragmento $\Delta phaP1$ e $\Delta phaP2$ com as enzimas Sall e BamHI e também do vetor pK18mobsacB. Esse vetor se integra ao cromossomo bacteriano e através de dois eventos de recombinação homóloga promove a deleção do gene de interesse.

A estratégia empregada nesse procedimento é a inclusão de um marcador de seleção negativa ao vetor empregado na mutagênese. Este marcador possibilitará a aplicação de uma pressão de seleção negativa para isolamento de transformantes que tenham perdido o vetor integrado ao genoma, ou seja, os transformantes que tenham sofrido o segundo evento de recombinação. Um marcador de seleção negativa, deste tipo, é o gene *sacB*, isolado de *Bacillus subtilis* (SIMON *et al.*, 1983). A expressão deste gene é letal para *H. seropedicae* na presença de sacarose no meio de cultura. A levano-sucrase codificada por este gene catalisa a formação de polímeros de frutose no envelope celular que são em seguida liberadas para o meio de cultura. Em bactérias gram-negativas onde o envelope celular compreende uma membrana externa e um espaço periplasmático, a expressão do gene *sacB*, na presença de sacarose, leva ao acúmulo de polímeros de frutose no espaço periplasmático resultando na lise da célula bacteriana (SCHAFFER *et al.*, 1994).

4.16 PROCEDIMENTO PARA SELEÇÃO DOS MUTANTES

Após conjugar o vetor contendo inserto de interesse, uma colônia transconjugante isolada foi inoculada em meio NFb-MalatoHPN sem antibióticos. A ausência de antibióticos nesta etapa é importante para a ocorrência do segundo evento de recombinação.

Após este cultivo prévio, foram plaqueados de 100µL a 200µL (diluição final de 1×10^{-4} a 2×10^{-4}) em meio NFb-Malato com baixa concentração de fosfatos (15,94 g/L de KH_2PO_4 e 1,78 g/L de K_2HPO_4), 5% de sacarose, estreptomicina 80 µg/mL, ácido nalidíxico 5 µg/mL e canamicina 500 µg/mL. Em aproximadamente 36-48 horas, caso o segundo evento de recombinação tenha ocorrido, foi possível observar as colônias relativamente grandes em placa.

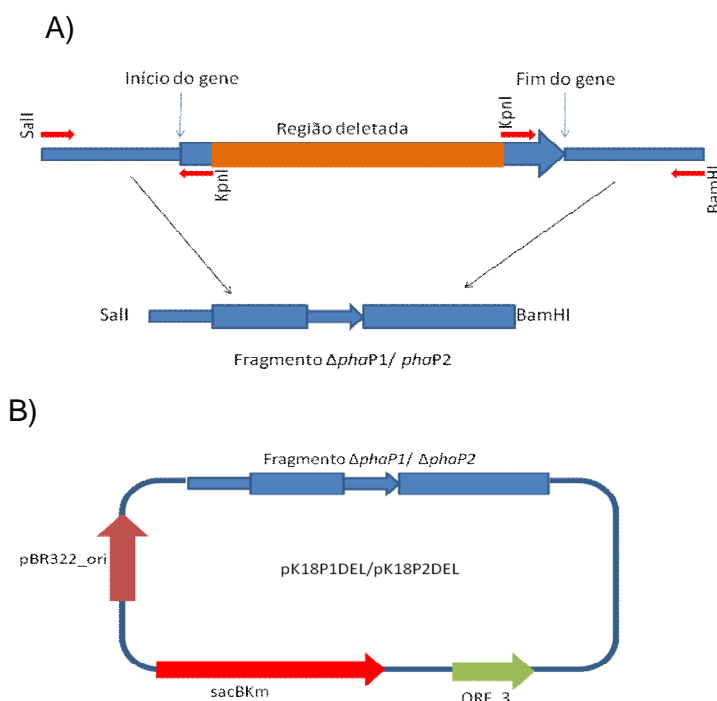


Figura 3- ESTRATÉGIA DE CONSTRUÇÃO DOS VETORES PARA DELEÇÃO DOS GENES *phaP1* ou *phaP2* . Primeiro é realizada a construção dos fragmentos de deleção de *phaP1* ou *phaP2* (A) e posteriormente clonados em vetor suicida pK18mobsacB (B) para integração no genoma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO GRÂNULO DE PHB

Os grânulos de PHB produzidos por inúmeras bactérias são compostos não somente por polímero, mas também por muitas proteínas e lipídeos (GRIEBEL, SMITH e MERRICK, 1968; MAYER, 1992; DENNIS *et al.*, 2003). Essas proteínas em geral têm uma função importante na estrutura, síntese ou degradação do grânulo. Nesse trabalho além das proteínas associadas ao grânulo já relatadas na literatura,

foram identificadas também demais proteínas sem relação aparente com o polímero sua possível função e relação com o polímero serão discutidas. Para isso as proteínas foram extraídas e separadas em gel SDS-PAGE conforme descrito em materiais e métodos e o resultado está mostrado na Figura 4.

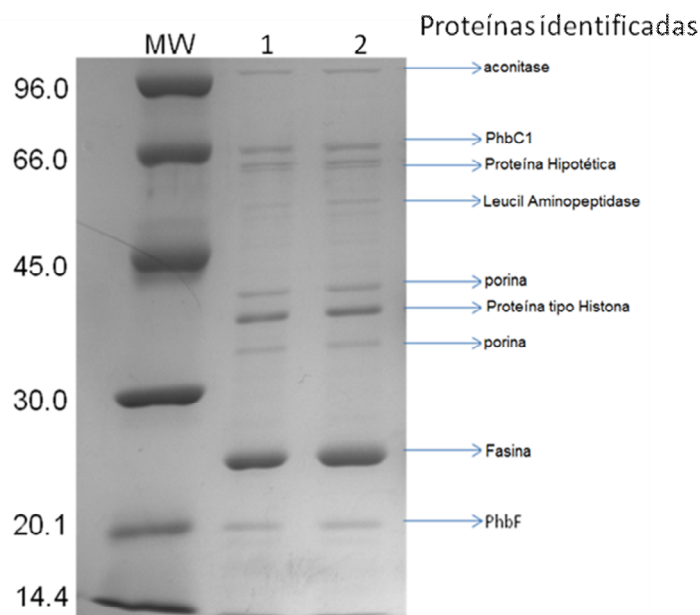


Figura 4- GEL SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES ASSOCIADAS AO GRÂNULO DE PHB DE *H. seropedicae*. As proteínas foram extraídas dos grânulos por fervura em 30 μ L de tampão de amostra e foram aplicadas em gel de poliacrilamida. Linha MW indica os marcadores de massa molecular (em kDa); linhas 1 e 2 indicam as proteínas associadas ao grânulo de PHB. O procedimento está descrito nos materiais e métodos. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 10% (m/v) (SDS-PAGE). As proteínas foram coradas com Comassie Blue R-250 e identificadas através de espectrometria de massas.

Como pode se observar na Figura 4, uma boa quantidade de proteínas foi resolvida de maneira satisfatória justificando a utilização de eletroforese unidimensional. Além dessas proteínas mais abundantes algumas proteínas de quantidade reduzidas também estão presentes no gel. Para sua identificação um novo gel foi feito, porém, com uma quantidade maior de suspensão de grânulos (75 μ L), para que as proteínas menos abundantes fossem visualizadas de forma mais evidente. O resultado está mostrado na Figura 5.

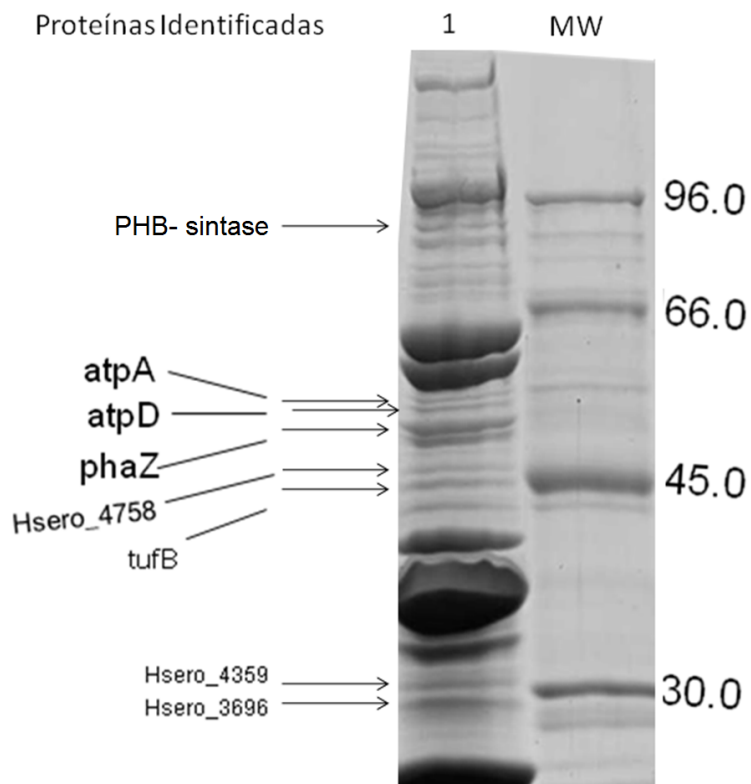


Figura 5- GEL SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO GRÂNULO DE PHB DE *H. seropedicae*. As proteínas foram extraídas da suspensão de grânulos (75µL) por fervura em tampão de amostra e aplicadas. Linha MW indica os marcadores de massa molecular (em kDa); linha 1 indica as proteínas associadas ao grânulo de PHB. As de menor abundância estão indicadas. O procedimento está descrito nos Materiais e Métodos. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 7,5% (m/v) (SDS-PAGE). As proteínas foram coradas com Comassie Blue R-250 e identificadas através de espectrometria de massas.

Depois de realizada a separação das PAG (proteínas associadas ao grânulo) as mesmas foram retiradas do gel e tripsinizadas para identificação por espectrometria de massa. A Tabela 7 contém a lista das proteínas mais abundantes identificadas por espectrometria de massa bem como alguns parâmetros de identificação e na Tabela 8 as proteínas menos abundantes

Dentre as proteínas associadas ao grânulo destaca-se a presença de proteínas envolvidas na estrutura e função do grânulo (fasina, sintase, depolimerase, PhbF), porém, algumas proteínas ainda não relatadas foram encontradas como: aconitase, proteína tipo histona, proteínas hipotéticas e porinas. A presença das mesmas

associadas ao PHB será discutida adiante, como também sua função no metabolismo celular.

Vários trabalhos descrevem a presença das PAG de PHB e sua função seja na síntese, degradação ou estrutura do grânulo, demonstrando a clara necessidade da associação destas proteínas com o polímero em outros microorganismos (STUBBE *et al.* 2003; DENNNIS *et al.*, 2003; PIEPER *et al.* 1992; MAEHARA *et al.*, 1999; STEINBÜCHEL *et al.*, 1995; HAN, YOON e LEE, 2001; TESSMER *et al.*, 2007; YORK *et al.*, 2001a; KUCHTA *et al.*, 2007). Neste trabalho, várias dessas proteínas foram encontradas, corroborando com os resultados encontrados anteriormente.

Conforme descrito em outros trabalhos a fasina apresentou-se como a proteína mais abundante representando mais de 30% das PAG e será objeto de maior estudo adiante nesse trabalho. Teoricamente a fasina deveria migrar como uma proteína de aproximadamente 20 kDa porém, conforme já demonstrado por Chaves e colaboradores (2008) ela é uma proteína de migração anômala e no gel ela aparece na região em torno de 25 kDa. Sua função já foi descrita e caracterizada, sendo uma proteína essencialmente estrutural, sendo sua presença na superfície do grânulo necessária para evitar que os grânulos de PHB coalesçam (WIECZOREK *et al.*, 1995; PIEPER-FURST *et al.*, 1994; FULLER *et al.*, 1992; PIEPER-FURST *et al.*, 1995; MAEHARA *et al.*, 1999; KUCHTA *et al.*, 2007; STEINBÜCHEL *et al.*, 1995). Trabalhos recentes têm atribuído novas funções às fasinas. A partir da identificação de um nova fasina, PhaP5, em *R. eutropha* por Pfeiffer e Jendrossek (2011), posteriormente foi relatado que essa nova fasina auxilia na distribuição dos grânulos de PHB entre as células filhas no momento da divisão celular por interação com o nucleóide através de PhaM (proteína tipo histona) (PFEIFFER, WAHL e JENDROSSEK, 2011). Essa interação de PhaP5, PhaM e grânulos de PHB com o nucleóide leva a uma polarização dos grânulos facilitando na distribuição do PHB entre as células filhas (PFEIFFER, WAHL e JENDROSSEK, 2011).

O modelo de regulação gênica descrita para as fasinas assume a existência de uma proteína regulatória negativa, PhbF, sendo que a mesma está associada ao promotor da fasina bloqueando a sua expressão. No momento em que é iniciado a produção do polímero, PhbF, é seqüestrada para o polímero liberando a expressão dos genes reprimidos pela mesma, tal como a fasina (YORK *et al.*, 2001b; PÖTTER *et al.*, 2002; MAEHARA *et al.*, 2001; MAEHARA *et al.*, 1999; PÖTTER *et al.*, 2005,

KADOWAKI *et al.*, 2011). Esse modelo foi comprovado *in vitro* tendo também alguns trabalhos que demonstram *in vivo* a capacidade de PhbF interagir com os grânulos (YAHAMA *et al.*, 2007; PÖTTER *et al.*, 2002; MAEHARA *et al.*, 1999). O presente trabalho fornece mais uma evidência da associação da proteína PhbF com o polímero de PHB com resultados *in vivo* através de SDS-PAGE, representando a mesma aproximadamente 2% das proteínas totais encontradas associadas ao grânulo. Essa associação concorda com os resultados demonstrados por Kadowaki e colaboradores (2011), onde PhbF inibe a transcrição de seus genes alvos, indicando que a regulação dos genes do PHB em *H. seropedicae* deva seguir o modelo de *R. eutropha*.

Tabela 7- IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS MAIS ABUNDANTES IDENTIFICADAS ASSOCIADAS AOS GRÂNULOS DE PHB

Proteína	MM_teor. (kDa)	pI_teor.	Score	Cob (%)	Matches	MM_exp (kDa)	%vol	Identificação do gene	Erro (ppm)
acnA aconitase hidratase	97,46	6,61	70	7	5/5	108,83	5	Hsero_2979	40
phbC sintetase	64,70	7,70	63	9	4/4	69,29	12	Hsero_2999	31
Hsero_3471 hipotética	61,47	8,65	62	11	5/8	64,4	14	Hsero_3471	53
Hsero_4241 hipotética	58,43	9,41	118	20	9/12	61,3	2	Hsero_4241	66
leucil aminopeptidase	52,82	9,04	86	14	6/77	55,4	2	Hsero_3109	67
Hsero_4295 Porina	39,37	9,40	120	33	8/11	42	5	Hsero_4295	63
Proteína tipo histona*	26,86	11,76	77	6	*	39	17	Hsero_0382	24
Hsero_3696 Porina	21,30	9,45	89	23	6/15	35	5	Hsero_3696	52
Hsero_1639 fasina	19,79	6,75	163	79	11/26	24	34	Hsero_1639	39
phbF (regulatória)	21,47	5,72	79	48	6/6	20	2	Hsero_2997	8

*proteína tipo Histona só foi possível realizar identificação por MS2 (peptídeo- TVLNPAAWPFPTGNNRP.- (Score de identificação 77)). MM exp. = MM experimentais calculados pela migração no gel 1D utilizando o programa LabScan; pI e MM teor. = pI e MM teórico calculado pelo programa MASCOT; ORF = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org); Matches = número de peptídeos obtidos experimentalmente que coincidiram com os peptídeos obtidos da clivagem *in silico* da sequência da proteína; Cob (%) = porcentagem de cobertura dos peptídeos experimentais que coincidiram com os teóricos; %vol= abundância relativa das proteínas identificadas, determinada pelo programa LabScan; Score= Dado fornecido pelo programa MASCOT, quanto maior o valor de Score menor a chance da identificação ser um evento aleatório, valor de corte mínimo é de 50.

Tabela 8- IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS ASSOCIADAS AOS GRÂNULOS DE PHB

Proteína	MW_teor.	pl_teor.	Score	Cob (%)	Matches	MW_exp (kDa)	%vol	Identificação do gene	Erro (ppm)
rpoB RNA polimerase	152638	5,59	52	4	6/8	160,1	<1	Hsero_0105	45
phaC sintetase	91864	8,13	141	12	1/13	92,1	<1	Hsero_2625	66
atpD F0F1-tipe ATP sintase	50311	5,17	129	30	9/12	56,2	<1	Hsero_4362	72
atpA F0F1-tipe ATP sintase	55055	6,17	63	10	5/8	58,6	<1	Hsero_4364	85
phaZ depolimerase	46561	6,06	206	39	12/13	50,5	<1	Hsero_1622	60
Hsero_4758 fosfolipase	43847	5,85	83	15	6/8	47,1	<1	Hsero_4758	84
tufB fator de alongação	43015	5,48	64	17	4/5	45,2	<1	Hsero_0097	39
GTPase fator de alongação	43015	5,48	64	17	4/5	45,2	<1	Hsero_0112	39
Hsero_4359 hipotética	31207	9,39	144	37	8/8	29,3	<1	Hsero_4359	51

MM exp. = MM experimentais calculados pela migração no gel 1D utilizando o programa LabScan; pl e MM teor. = pl e MM teórico calculado pelo programa MASCOT ; ORF = número de identidade da ORF na sequência genômica de *H. seropedicae* (www.genopar.org); Matches = número de peptídeos obtidos experimentalmente que coincidiram com os peptídeos obtidos da clivagem *in silico* da sequência da proteína; Cob (%) = porcentagem de cobertura dos peptídeos experimentais que coincidiram com os teóricos; %vol= abundância relativa das proteínas identificadas, determinada pelo programa LabScan; Score= Dado fornecido pelo programa MASCOT, quanto maior o valor de Score menor a chance da identificação ser um evento aleatório, valor de corte mínimo é 50.

Dentre as proteínas identificadas uma que deve estar ligada ao grânulo devido sua função chave na polimerização das cadeias do polímero é a PHB polimerase. Enzima responsável pela síntese do polímero, através da formação de um dímero da proteína, ela que oligomeriza as subunidades de ácido 3-hidroxibutírico, gerando longas cadeias homopoliméricas, sendo que sua presença na superfície do grânulo já foi demonstrada (GERNGROSS, *et al.*, 1993; JENDROSSEK, SELCHOW e HOPPERT, 2007; LIEBERGESELL e STEINBÜCHEL, 1994; REN *et al.*, 2009). A PHB polimerase mais abundante encontrada foi a PhbC1 (Hsero_2999) representando 12% das proteínas totais. No contexto genômico em que ela se encontra temos ainda o gene que codifica para a proteína regulatória *phbF* (Hsero_2997) e para acetoacetil-CoA redutase (Hsero_2998). A proximidade genômica destes genes já foi descrito para outros organismos (POHLMANN, FRICKE e REINECKE, 2006). Além desta, outra PHA polimerase, Hsero_2625, foi encontrada associada ao polímero, porém, com uma abundância muito menor se comparada à PhbC1. Como já foi descrito que o *Herbaspirillum seropedicae* é capaz de produzir além do PHB seu copolímero polihidroxivalerato (CATALÁN *et al.*, 2007), é necessário investigar se a outra polimerase não seria responsável pela síntese do copolímero.

Após a síntese do polímero, o mesmo funciona como um estoque energético para a bactéria, podendo então em momentos de escassez de nutrientes ser utilizado para suprir a demanda celular (SCHLEGEL, GOTTSCHALK e VON BARTHA, 1961; HANDRICK, REINHARDT e JENDROSSEK, 2000). A sua mobilização para fornecimento de energia é realizado por enzimas denominadas PHB depolimerases (JEDROSSEK e HANDRICK, 2002). Logo, é esperado que as mesmas se encontrem associadas à estrutura do polímero, conforme evidenciado neste trabalho. A presença de depolimerases na superfície do grânulo apesar da quantidade ser diminuta (<1%) já foi relatada anteriormente, corroborando os resultados apresentados (DE EUGENIO *et al.*, 2007; REN *et al.*, 2009; UCHINO *et al.*, 2007). Essa quantidade reduzida de depolimerases pode ser justificada pelo momento em que foi coletado os grânulos (~DO 1.0) onde provavelmente não

está ocorrendo a mobilização do grânulo. Parece antagônica a presença de polimerases e depolimerase simultaneamente na superfície do polímero, podendo ocorrer um ciclo fútil de síntese e degradação do mesmo, porém, possivelmente exista mecanismo de regulação pós-traducional impedindo isso. No entanto, a presença de depolimerases e polimerases associadas ao PHB simultaneamente, pode ser uma maneira de resposta rápida às flutuações de metabólitos na célula sem a necessidade de transcrever e traduzir os genes repetidamente.

Além das proteínas comumente relatadas outras proteínas foram encontradas associadas ao polímero, mas com função incerta ou ainda não relatada. A proteína leucil aminopeptidase encontrada representa aproximadamente 2% das proteínas totais. Sua associação com a estrutura do polímero já foi descrita em *P. putida* (REN *et al.*, 2009). Apesar de ser uma proteína com função proteolítica pronunciada e também atuar como um regulador transcricional através de ligação ao DNA (MATSUI, FOWLER e WALLING, 2006), sua associação ao grânulo não é clara. Hipoteticamente, a mesma pode atuar regulando genes envolvidos na produção do polímero ou então participando na complexação polímero-cromatina.

Outras duas proteínas hipotéticas conservadas foram identificadas associadas ao grânulo, Hsero_3471 e Hsero_4241. Análises no Pfam e Blast (FINN *et al.*, 2010; ALTSCHUL *et al.*, 1990) mostraram que as mesmas não apresentam nenhum motivo ou domínio conhecido, e sua função é totalmente desconhecida. Logo, resta estudar o motivo de sua associação ao grânulo e a importância dessa associação. É necessária a construção de mutantes e análise transcricional, para determinar suas funções em *H. seropedicae*.

Além dessas proteínas, foram identificadas também duas porinas de membrana externa que juntas representam aproximadamente 16% das proteínas totais associadas ao grânulo de PHB. A princípio, a presença de porinas pode indicar um problema na extração dos grânulos, pois, como são proteínas altamente hidrofóbicas poderiam se unir ao polímero inespecificamente. No entanto, essa presença pode ser justificada tanto pelo modelo de biossíntese do grânulo quanto pela função catalítica das enzimas de degradação do polímero. Com relação à biossíntese conforme discutido na

revisão bibliográfica dois modelos são aceitos: brotamento e micelar (WALTERMANN e STEINBÜCHEL, 2005). A presença dessas porinas pode ser explicada pelo modelo de brotamento do grânulo que durante a biossíntese, juntamente com as proteínas associadas o grânulo pode trazer consigo alguns pedaços da membrana celular, justificando a presença dessas porinas. De outra forma, a função catalítica de enzimas como as depolimerases justifica a presença de porinas na ultraestrutura do grânulo. Essas porinas funcionariam como dutos que levariam água para o interior do grânulo para que as depolimerases, que essencialmente se comportam como hidrolases, possam atuar degradando o polímero. Sendo essa última hipótese aventada por Dennis e colaboradores em 2003, a partir de resultados utilizando microscopia de força atômica, onde estruturas semelhantes a poros se encontravam na superfície do polímero.

Dessas novas PAG identificadas a presença da aconitase é surpreendente, ela representa aproximadamente 7% das proteínas totais do grânulo e sua relação com o mesmo é ainda desconhecida. Conforme descrito na literatura essa enzima metaloprotéica está envolvida na estereoisomerização de citrato à isocitrato via cis-aconitato no ciclo do ácido cítrico (BEINERT e KENNEDY, 1993; FLINT e ALLEN, 1996; BEINERT, KENNEDY e STOUT, 1996). Sua ligação ao PHB é inédita e sua presença como uma PAG pôde gerar dois modelos para explicar essa associação. O primeiro, demonstrado na Figura 6, seria que a bactéria, quando está produzindo PHB não necessita de uma alta velocidade do ciclo de Krebs já que o mesmo irá gerar mais energia e no momento da produção de PHB existem grandes aportes de energia e a bactéria necessita estocar essa energia excedente (MADISON e HUISMAN, 1999). Logo, a aconitase poderia ser seqüestrada para o polímero, reduzindo a velocidade do ciclo de Krebs. Essa redução do “pool” de aconitase levaria a um acúmulo de citrato, que é convertido em acetil-CoA e oxalacetato pela ação da citrato liase. Em eucariotos sabe-se que essa enzima, citrato liase, é chave na biossíntese de lipídeos pela ligação do metabolismo de carboidratos e ácidos graxos (SUN *et al.*, 2010; ELSHOURBAGY *et al.*, 1992). Em bactérias, o acetil-CoA gerado pela citrato liase pode ser deslocado para biossíntese de PHB pela

ação da Beta-cetotiolase, que em última análise será utilizada para produção do polímero.

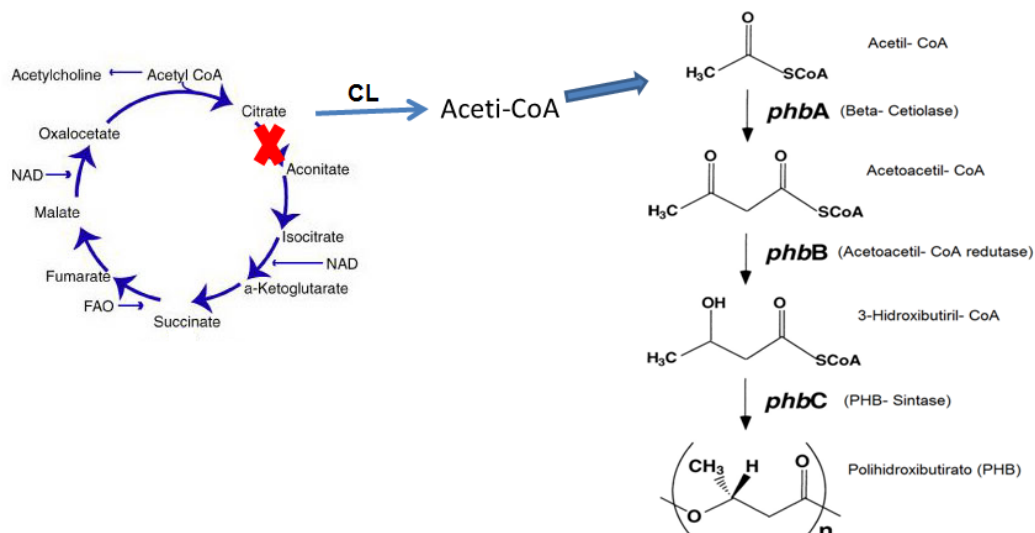


Figura 6- Modelo de regulação proposto para presença da aconitase nos grânulos e ação do PHB no Ciclo do Ácido Cítrico. CL= Citrato Liase.

A segunda seria que a aconitase, em condições de estresse químico (espécies reativas de oxigênio), perde seu cluster ferro-enxofre, podendo ligar mRNAs (GREEN e PAGET, 2004; BEINERT *et al.*, 1996). Porém, a perda do cluster, torna a aconitase altamente hidrofóbica podendo formar agregados protéicos, logo, os grânulos de PHB devido a sua característica hidrofóbica pode atuar seqüestrando e impedindo a formação dos agregados. Essa atuação seria semelhante com o que foi descrito para GroEL (GRUPTA, MISHRA e CHAUDHURI, 2010).

Dessas novas PAG uma que chama atenção especial é a proteína tipo Histona (Hsero_0382), que representa 17% das proteínas totais, sendo então a segunda proteína mais abundante no grânulo. A função das proteínas tipo histona com o PHB passou a ser desvendada recentemente, onde dois trabalhos publicados por Galán e colaboradores (2011) e Pfeiffer e colaboradores (2011a) demonstram a importância da associação proteína tipo histona-polímero na distribuição do polímero entre as células filha. As duas proteínas relatadas nesses trabalhos respectivamente denominadas PhaF e

PhaM apresentam domínios AAKP para PhaF e PAKKA para PhaM, além de alto conteúdo de lisina e arginina. No caso da proteína tipo histona encontrada nesse trabalho, a mesma apresenta domínios AAKK e AAPK, sendo que 45% dos aminoácidos são alaninas e 28% lisinas. Provavelmente sua função deva ser similar à apresentada por PhaF e PhaM, contudo mais estudos devem ser realizados para a esclarecer a sua função como proteína associada ao grânulo em *H. seropedicae*.

As demais proteínas identificadas como RNA polimerase, subunidades da ATP sintase, fosfolipase, fatores de alongação ribossomal (Etuf) e proteína hipotética Hsero_4359 foram identificadas no gel de 7.5% e cada uma representa menos que 1% das proteínas totais. Devido à baixa concentração dessas proteínas, se comparada às demais, presença das mesmas como contaminantes na preparação dos grânulos não pode ser descartada assim como a possibilidade de co-purificação com os grânulos.

5.2 CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS MUTANTES PARA FASINA PhaP1 (TP1) e PhaP2 (TP2)

Conforme resultados obtidos, a fasina é a proteína mais abundante na superfície do grânulo representando 34% das proteínas totais. Vários trabalhos têm demonstrado a importância da fasina na estrutura do polímero (STEINBÜCHEL *et al.*, 1995; YORK *et al.*, 2001a,b; PÖTTER *et al.*, 2004; 2005). Para melhor caracterizar a função dessa proteína em *H. seropedicae* foram construídos mutantes por deleção para as duas fasinas encontradas no genoma, *phaP1* (Hsero_1639) e *phaP2* (Hsero_4759).

A estratégia de deleção parcial já foi descrita nos materiais e métodos. Os plasmídeos pK18P1DEL e pK18P2DEL foram conjugados separadamente em *H. seropedicae* através de *E. coli* S17.1 para que fossem obtidos os transconjugantes. Em um primeiro momento o plasmídeo contendo o gene parcialmente deletado é integrado ao genoma por meio de recombinação homóloga. Esse primeiro evento foi verificado por meio de reação de PCR, onde é possível observar a amplificação dos dois genes: o selvagem e o gene parcialmente deletado conforme mostrado na Figura 7A para mutante *phaP1* e figura 8A para mutante *phaP2*.

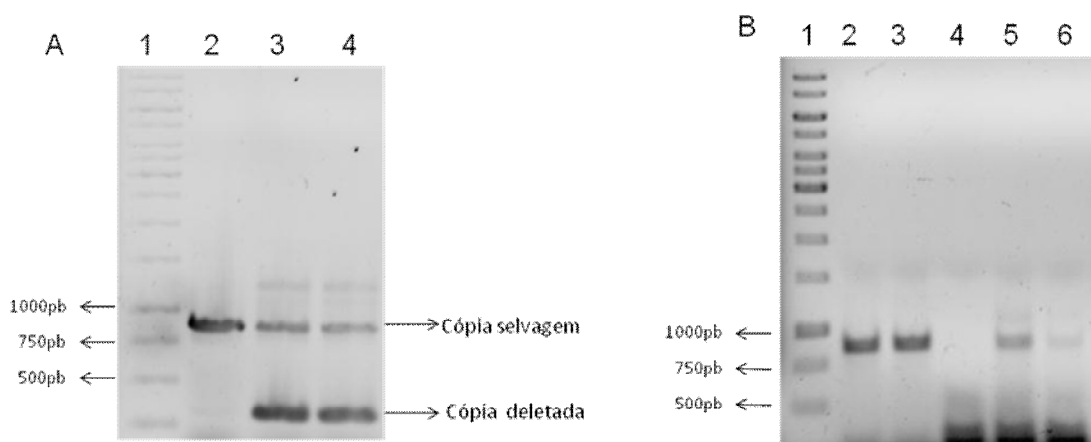


Figura 7- PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTOS DE PCR DAS REAÇÕES PARA CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES DE *H. seropedicae* SMR1 NO GENE *phaP1*. A) Perfil eletroforético para confirmação do primeiro evento de recombinação, por PCR, para gene *phaP1*. Coluna 1, marcador de pares de base 1 Kb Ladder (Fermentas); Coluna 2, Estirpe selvagem; Coluna 3 e 4 simples recombinantes do gene *phaP1*. B) Perfil eletroforético para confirmação do segundo evento de recombinação, por PCR, para gene *phaP1*. Coluna 1, marcador de tamanho 1 Kb Ladder (Fermentas); Coluna 2, Estirpe selvagem; Coluna 3, estirpe mutante que reconstituiu a cópia selvagem; Coluna 4, estirpe mutante com gene parcialmente deletado; Colunas 5 e 6, estirpes mutantes que mantiveram tanto cópia mutante quanto selvagem. Amostra corrida em gel de agarose 1% em TBE 1X. O gel foi corado com brometo de etídio.

Após o segundo evento de recombinação o plasmídeo é removido do genoma. Consigo ele carrega uma das cópias do gene, assim apenas a cópia selvagem ou parcialmente deletada, permanece no genoma. A cópia resultante foi verificada por amplificação por PCR conforme demonstrado na figura 7B para mutante *phaP1* e figura 8B para mutante *phaP2*.

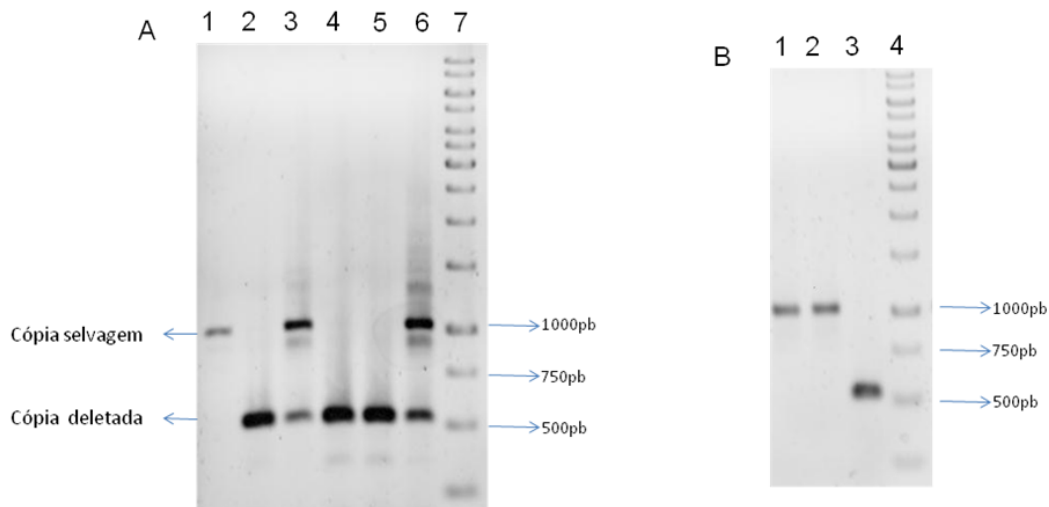


Figura 8- PERFIL ELETROFORÉTICO DAS REAÇÕES DE PCR PARA CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES DE *H. seropedicae* SMR1 NO GENE *phaP2*. A) Perfil eletroforético para confirmação do primeiro evento de recombinação, por PCR, para gene *phaP2*. Coluna 1, Estirpe Selvagem; Coluna 3 e 6, simples recombinantes com as duas cópias; Coluna 2, 4 e 5 estirpe mutante já deletada; Coluna 7, marcador de pares de base 1 Kb Ladder Fermentas B) Perfil eletroforético para confirmação do segundo evento de recombinação, por PCR, para gene *phaP2*. Coluna 1, estirpe selvagem; Coluna 2, estirpe mutante que reconstituiu a cópia selvagem; Coluna 3, Estirpe mutante com gene parcialmente deletado; Coluna 4, marcador de tamanho 1 Kb Ladder (Fermentas). Amostra corrida em gel de agarose 1% em TBE 1X. O gel foi corado com brometo de etídio.

Confirmados os mutantes por deleção dos genes *phaP1* e *phaP2* eles foram denominados respectivamente *H. seropedicae* TP1 e *H. seropedicae* TP2.

Para construção do duplo mutante $\Delta phaP1phaP2$ (*H. seropedicae* TP1P2), o mutante TP1 foi conjugado com o plasmídeo pK18P2DEL. A seleção do duplo mutante foi feita como descrito anteriormente e, os resultados estão mostrados na figura 9.

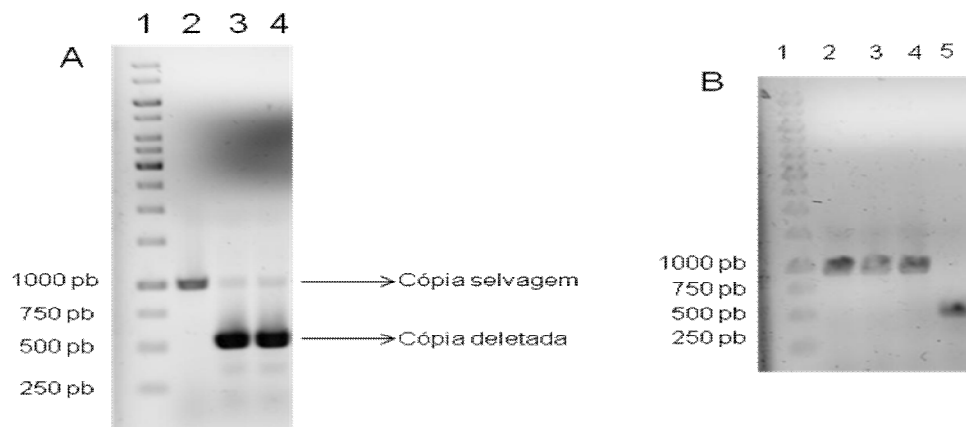


Figura 9- PERFIL ELETROFORÉTICO DAS REAÇÕES DE PCR PARA CARACTERIZAÇÃO DOS DUPLOS MUTANTES DE *H. seropedicae* TP1 NO GENE *phaP2*. A) Perfil eletroforético para confirmação do primeiro evento de recombinação, por PCR, para obtenção do duplo mutante TP1P2 pela deleção do gene *phaP2*. Coluna 1, marcador de pares de base 1 Kb Ladder Fermentas; Coluna 2, estirpe *H.seropedicae* TP1; Coluna 3 e 4 simples recombinantes com as duas cópias. B) Perfil eletroforético para confirmação do segundo evento de recombinação, por PCR, para gene *phaP2*. Coluna 1, marcador de tamanho 1 Kb Ladder Fermentas; Coluna 2, estirpe *H. seropedicae* TP1; Coluna 3 e 4, estirpe mutante que reconstituiu a cópia selvagem; Coluna 4, estirpe mutante *H. seropedicae* TP1P2. Amostra corrida em gel de agarose 1% em TBE 1X. O gel foi corado com brometo de etídio.

Construídos os mutantes por deleção dos genes *phaP1*, *phaP2* e o duplo mutante, os mesmos foram caracterizados com relação à suas proteínas associadas ao grânulo. Para isso o mesmo procedimento foi realizado para extração dos grânulos, proteínas e separação das mesmas por SDS-PAGE. Uma análise macroscópica empírica da suspensão de grânulos era possível verificar que os grânulos da estirpe TP1 apresentavam aspecto diferenciado de forma que os mesmos ficavam sob forma de grumos e não em suspensão como os da estirpe selvagem e mutante TP2 (dados não apresentados).

Após extração e purificação dos grânulos por sonicação e gradiente de glicerol, as proteínas foram então extraídas para sua separação por SDS-PAGE e identificação por espectrometria de massas. Conforme demonstrado na figura 10 o perfil de proteínas seguiu inalterado no mutante TP1 em relação à estirpe selvagem, inclusive com a manutenção de uma banda de aproximadamente 25 kDa, exatamente na região da PhaP1. Análise por

espectrometria de massa revelou que se tratava da proteína PhaP2, sugerindo então uma substituição pelo menos parcial de PhaP1 por PhaP2, ocorrendo a ligação de PhaP2 ao grânulo porém não sendo tão efetiva quanto PhaP1. Esse resultado é inédito, já que em nenhum outro organismo outra fasina conseguiu substituir a fasina majoritária (PÖTTER *et al.*, 2004).

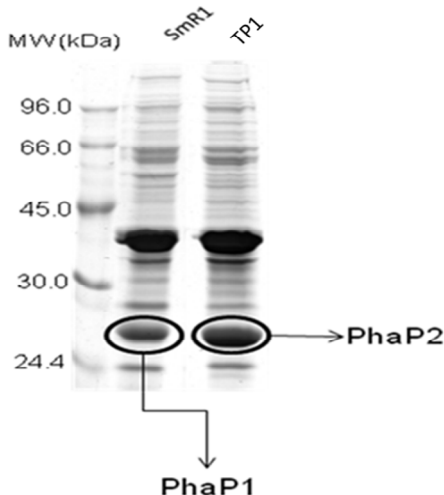


Figura 10- ELETROFORESE SDS-PAGE DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO GRANULO NA ESTIRPE SMR1 E MUTANTE *phaP1* (TP1). Perfil das proteínas associadas ao grânulo de PHB. As proteínas foram extraídas da suspensão de grânulos (30 μ L) por fervura em tampão de amostra e aplicadas. Linha MW indica os marcadores de massa molecular (em kDa); linha SmR1 e TP1 indicam respectivamente as proteínas associadas ao grânulo de PHB estirpe selvagem e na mutante *phaP1*. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 7,5% (m/v) (SDS-PAGE) de proteínas associadas aos grânulos de PHB. O procedimento está descrito nos materiais e métodos. As proteínas foram coradas com Comassie Blue.

Analisando os resultados obtidos pelo programa MASCOT (PERKINS *et al.*, 1999) foi possível verificar que além de PhaP2 uma outra proteína, Hsero_2402, com 30% de cobertura se encontrava naquela banda, tendo portanto uma mistura de peptídeos. Através do Pfam foi verificado que essa proteína apresenta um domínio Fasina 2, indicando o que seria uma terceira fasina em *H. seropedicae* inicialmente não detectada na anotação do genoma. Apesar do domínio fasina 2 apresentar um “score” e apresentar baixa similaridade com PhaP1 (17%), Hsero_2402 (a partir deste ponto, denominada PhaP3) encontra-se ligada ao grânulo. Análise filogenética das fasinas de *H.*

seropedicae demonstram que PhaP1 e PhaP2 se encontram próximas filogeneticamente enquanto PhaP3 fica deslocada em um outro ramo mais próxima do controle negativo (“out group”) NifA do que das próprias fasinas (FIGURA 11). No entanto o mesmo ocorre para PhaP5 de *R. eutropha* e já foi demonstrado que apesar de apresentar baixa similaridade a grande distância filogenética das demais fasinas de *R. eutropha*, PhaP5 tem a capacidade de se ligar a grânulos de PHB (PFEIFFER *et al.*, 2011b).

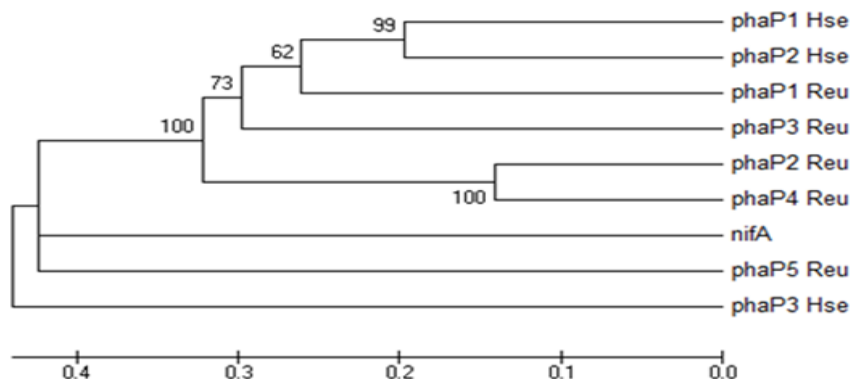


Figura 11- ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS FASINAS DE *H. seropedicae* e *R. eutropha* UTILIZANDO O MÉTODO NEIGHBOR-JOINING TREE. Árvore filogenética, construída utilizando o método neighbor-joining de fasinas de *H. seropedicae* e *R. eutropha*. Os valores de “bootstrap” para os ramos são dados nos nodos.

Análises computacionais das proteínas PhaP1 e PhaP2 usando os programas BLAST e ClustalW demonstram que as duas proteínas compartilham de uma alta similaridade em torno de 59%, e onde ocorrem trocas de aminoácidos essas trocas são conservadas não alterando de maneira drástica o comportamento da proteína (Figura 12). Utilizando o programa PSIPRED (JONES, 1999), foi possível verificar que tanto PhaP1 quanto PhaP2, provavelmente apresentem estrutura secundária predominante de alfa hélices (90%), assim como PhaP3. Essa predominância teórica de alfa hélices na estrutura secundária das fasinas já foi reportada por Neumann e colaboradores (2008) para *Ralstonia sp.* e segundo os autores pode ser responsável pela ligação das proteínas ao grânulo. PhaP3 apesar de apresentar baixa similaridade com PhaP1 (17%) e PhaP2 (14%) e um domínio fasina 2 de baixa homologia (E-value= 0.017), provavelmente deva apresentar como estrutura secundária predominante as alfa hélices (em torno de 75%). Essa

característica pode permitir que PhaP3 possa portanto se ligar ao grânulo de PHB conforme os resultados obtidos *in vivo*.

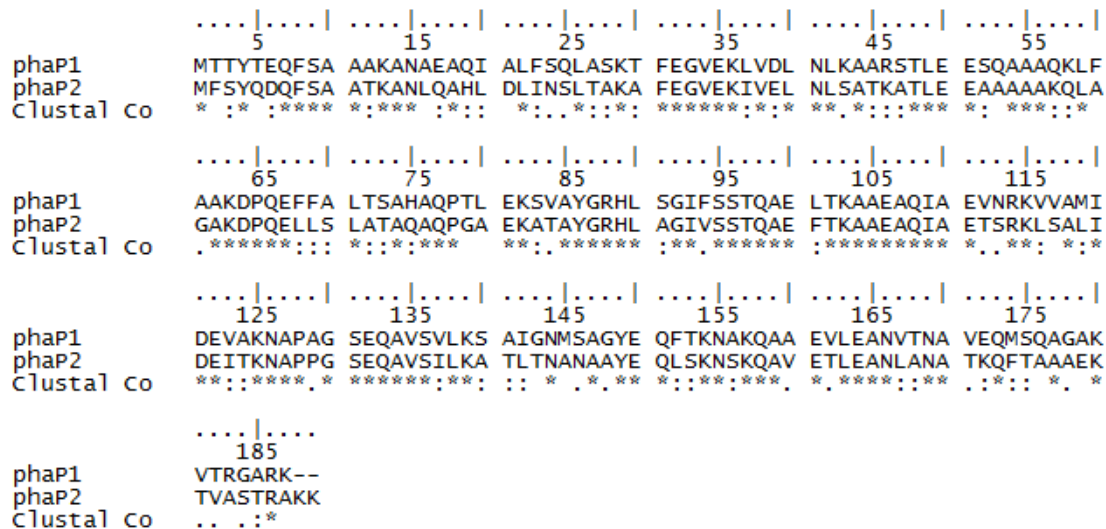


Figura 12- ALINHAMENTO DAS PROTEÍNAS PhaP1 E PhaP2 UTILIZANDO O PROGRAMA CLUSTALW. Alinhamento das proteínas PhaP1 e PhaP2 utilizando o programa ClustalW mostrando a alta similaridade e a troca por aminoácidos conservados.

5.3 ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES *phaP1* e *phaP2*

De acordo com os resultados obtidos em *H. seropedicae*, a fasina principal é PhaP1, porém na sua ausência, PhaP2 é capaz de se ligar à superfície do grânulo como a fasina mais abundante. Para verificar a atuação dessas proteínas é importante estudar a regulação gênica das mesmas. Para isso fusões transcricionais dos promotores foram construídas para se analisar a expressão gênica destes genes. As regiões promotoras de *phaP1* e *phaP2* foram clonadas em vetor pMP220 gerando respectivamente os plasmídeos ProP1lacZ e ProP2lacZ. Conforme descrito anteriormente, para a expressão de fasina é necessário que haja produção de PHB para que PhbF seja desligada do promotor. Para aprofundar os conhecimentos no que concerne à regulação gênica das fasinas em *H. seropedicae*, foi construído um mutante no gene *phbC1* (Hsero_2999). A estirpe mutante obtida, *H. seropedicae* TC1, foi incapaz de produzir ou produz quantidades diminutas de PHB não detectáveis por cromatografia gasosa (dados não mostrados).

Para construção da estirpe TC1, a estratégia foi a mesma utilizada para TP1 e TP2. O plasmídeo pK18C1DEL foi transferido para *H. seropedicae* SmR1 através de *E. coli* S17.1, integrando-se ao genoma ocorrendo assim o primeiro e posteriormente segundo evento de recombinação, sendo o último evento confirmado por PCR (Figura 13)

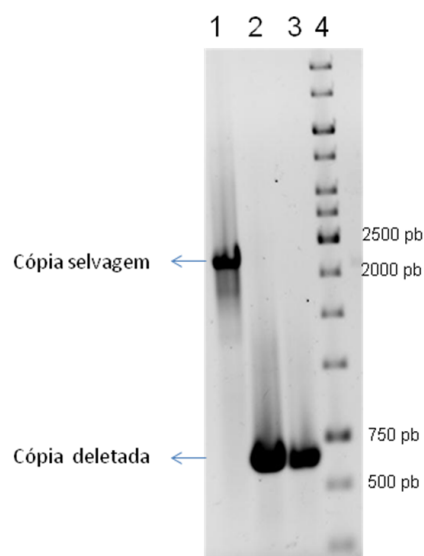


Figura 13- PERFIL ELETROFORÉTICO DAS REAÇÕES DE PCR PARA CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES DE *H. seropedicae* SMR1 NO GENE *phbC1*. A) Perfil eletroforético para confirmação do segundo evento de recombinação, por PCR, para obtenção do mutante TC1 pela deleção do gene *phbC1*. Coluna 1, Estirpe selvagem. Coluna 2 e 3, estirpe *H.seropedicae* TC1; Coluna 4, marcador de tamanho 1 Kb Ladder Fermentas. Amostra corrida em gel de agarose 1% em TBE 1X. O gel foi corado com brometo de etídio.

Tendo as fusões transcricionais ProP1lacZ e ProP2lacZ em *H. seropedicae* e nos mutantes TP1 e TC1, foi realizada a análise da expressão gênica dos genes *phaP1* e *phaP2*, para se verificar como ocorre a regulação destes genes.

Para analisar a expressão do gene *phaP1* o plasmídeo ProP1lacZ foi transferido para as estirpes: selvagem e TC1 e a transcrição gênica foi acompanhada ao longo de 24 horas através de ensaio de beta galactosidase. Os dados são apresentados na Figura 14.

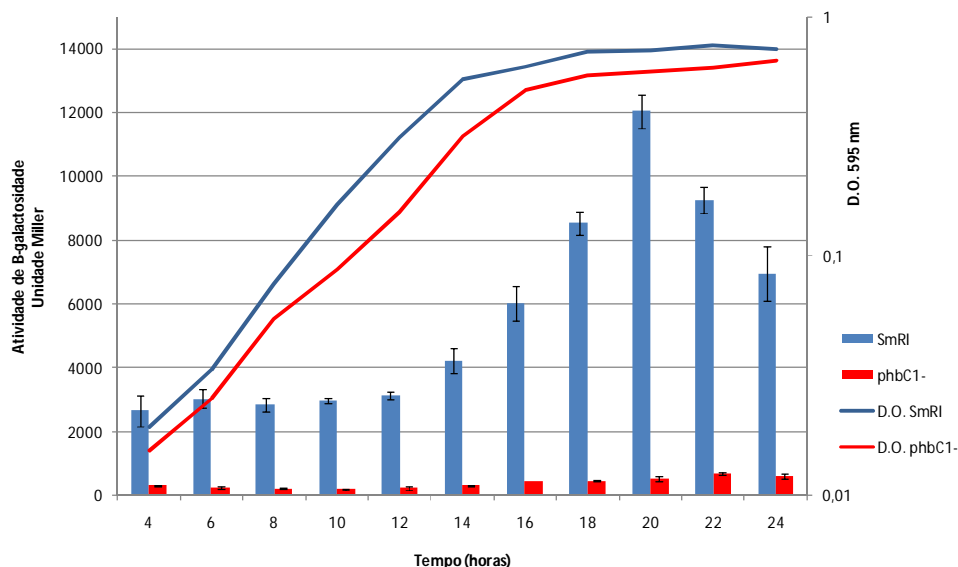


Figura 14- ANÁLISE TRANSCRICIONAL DO GENE *phaP1* NA ESTIRPE SELVAGEM E TC1. Perfil de expressão do gene *phaP1* de *H. seropedicae* em função da D.O.₅₉₅ das culturas, nas estirpes mutantes para o gene *phbC1* em comparação com a estirpe parental SmR1 (gráfico em barras). A D.O.₆₀₀ para o início dos experimentos foi de aproximadamente 0,01. Os controles negativos empregados foram: (1) a estirpe SMR1 sem nenhum plasmídeo e (2) contendo o vetor de fusão transcricional pMP220 (contendo o gene da β-galactosidase sem promotor). O gráfico de linhas representa a D.O.₅₉₅ das culturas indicando o perfil de crescimento das estirpes em azul SMR1, em vermelho TC1. As barras de erros representam o desvio padrão de três experimentos.

O perfil apresentado para expressão do gene *phaP1* nas estirpes SMR1 e TC1 está de acordo com o relatado na literatura, sendo que no mutante TC1, não ocorre a expressão da fasina devido sua incapacidade de produzir PHB logo, a proteína regulatória negativa está ligada ao promotor de *phaP1* impedindo a expressão, de acordo com os dados de Kadowaki e colaboradores (2011). Os resultados demonstram que *phaP1* atinge o pico de expressão no início da fase estacionária de crescimento, o que sugere indiretamente, que a máxima de produção do polímero ocorre também nesta fase de crescimento. Resultados que estão de acordo com os encontrados por Catalán e colaboradores (2007) que mostram que a máxima produção de PHB ocorre na fase estacionária. Esse acoplamento de síntese de grânulo e expressão de fasina já foi demonstrado em *R. eutropha* (YORK *et al.*, 2001) e a princípio

parece ser o único mecanismo de regulação da expressão da fasina, sendo esse modelo válido também para *H. seropedicae*.

Conhecido o perfil de expressão do gene *phaP1*, foi realizado o mesmo experimento de beta galactosidade para o análise da expressão do gene *phaP2* nas mesmas condições testadas anteriormente. A fusão ProP2lacZ foi transferida através de conjugação para as estirpes: SmR1, TP1 e TC1 e a expressão foi acompanhada por 24 horas. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 15.

A expressão de *phaP2* também é dependente da produção de PHB, assim como o gene *phaP1*, já que no mutante TC1 baixos níveis de expressão da beta-galactosidase foram observados. Portanto, assim como descrito na literatura e, observado para o gene *phaP1*, a expressão de *phaP2* é possivelmente regulada negativamente por PhbF.

Interessantemente, o gene *phaP2* não apresenta altos níveis de expressão na estirpe selvagem. Porém, quando o gene *phaP1* foi deletado da estirpe SMR1 gerando TP1 a expressão de *phaP2* aumentou consideravelmente, atingindo de uma forma geral a metade da expressão do gene *phaP1*. Esses resultados são inéditos, e corroboram os dados apresentados anteriormente onde, no gel de proteínas associadas aos grânulos da estirpe TP1 houve a substituição de PhaP1 por PhaP2.

Como relatado anteriormente o aspecto dos grânulos da estirpe TP1 é diferente da selvagem e TP2, logo, apesar de nos géis de proteína a proteína PhaP2 estar presente substituindo PhaP1 e seus níveis de expressão aumentarem com a deleção de *phaP1*, essa substituição possivelmente é parcial. Com isso, alguns grânulos podem coalescer e gerar um estresse para a célula, induzindo a ativação de fatores transcricionais que podem estar envolvidos na ativação do gene *phaP2*. Restam serem investigados quais fatores podem estar envolvidos nessa regulação já que esse comportamento não foi relatado na literatura.

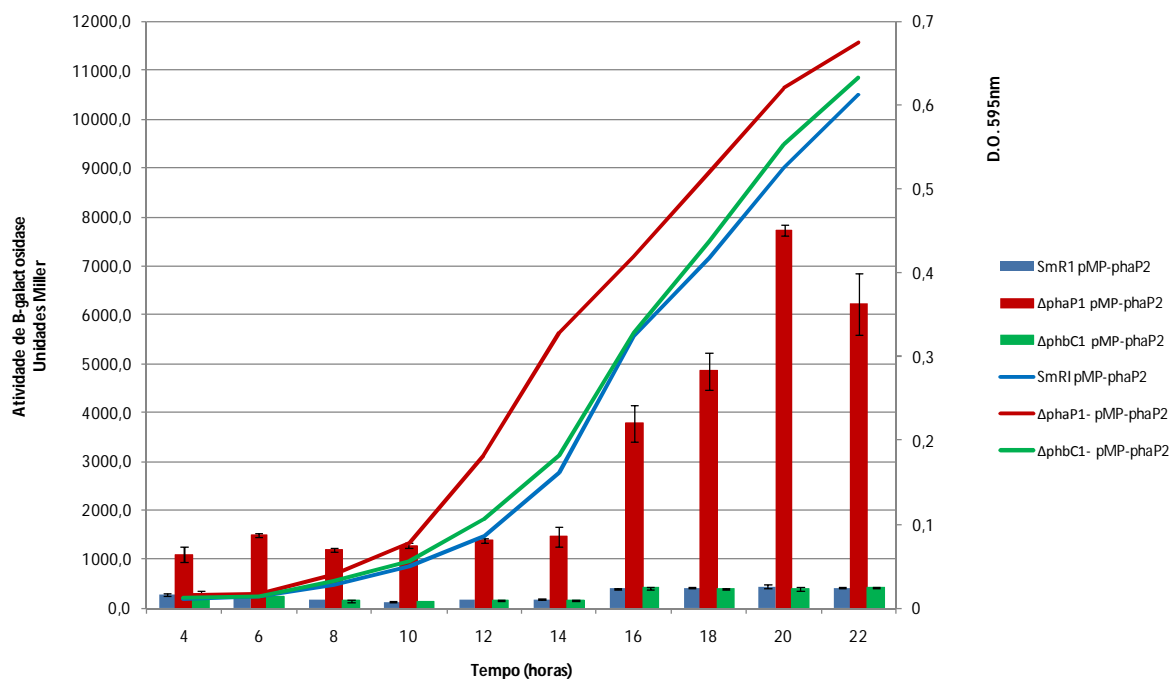


Figura 15- ANÁLISE TRANSCRICIONAL DO GENE *phaP2* NA ESTIRPE SELVAGEM, TP1 E TC1. Perfil de expressão do gene *phaP2* de *H. seropedicae* em função da D.O.₅₉₅ das culturas, nas estirpes mutantes para os genes *phaP1* e *phbC1* em comparação com a estirpe parental SmR1. A D.O.₆₀₀ para o início dos experimentos foi de aproximadamente 0,01. Os controles negativos empregados foram: a estirpe SMR1, TP1 e TC1 sem nenhum plasmídeo e também contendo o vetor de fusão transcricional pMP220 (contendo o gene da β-galactosidase sem um promotor). O gráfico de linhas representa a D.O.₅₉₅ das culturas indicando o perfil de crescimento das estirpes. As barras de erros representam o desvio padrão de três experimentos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O polihidroxibutirato é definido como uma forma de reserva energética e de equivalentes redutores para a célula, e que durante sua biossíntese e formação ocorre a associação de proteínas à sua estrutura conforme relatado em vários trabalhos. Sua principal proteína é a fasina e tem grande importância para manutenção da estabilidade do grânulo. Com relação ao funcionamento das fasinas de *H. seropedicae* com os resultados obtidos podemos afirmar que, PhaP1 (Hsero_1639) se trata da proteína mais abundante associada ao grânulo representando aproximadamente 34% das proteínas totais. Tanto a sua expressão quanto a de PhaP2 (Hsero_4759) são acopladas à produção do polímero, sendo reguladas negativamente por PhbF, que é titulada pelo polímero confirmando os resultados *in vitro* obtidos por Kadowaki e colaboradores (2011). A deleção parcial do gene *phaP1* levou a substituição de PhaP1 por PhaP2 na estirpe TP1, já que esse fato ainda não havia sido relatado na literatura, resultado esse confirmado tanto por experimentos de identificação das PAG por MALDI-ToF, quanto por ensaio de beta galactosidase na estirpe TP1. Resta investigar os fatores envolvidos na ativação do gene *phaP2* na ausência de PhaP1. A deleção parcial do gene *phaP1* também levou a descoberta de uma terceira fasina, PhaP3, que não estava anotada no genoma como tal, maiores estudos serão necessários para revelar sua real função no grânulo.

Além da fasina outras proteínas estão associadas ao polímero conforme descrito na literatura. *H. seropedicae* não parece ser uma exceção a essa regra contendo diversas proteínas associadas à sua estrutura como: fasina, PHB-sintase, depolimerase, proteínas tipo histona, aconitase, proteínas hipotéticas, porinas e outras. No entanto, os resultados apresentados nesse trabalho permitem levantar uma questão: de fato o PHB funciona apenas como reserva energética e equivalentes redutores? Definido por Jendrossek (2009) como carbonossomos, os grânulos de PHB parecem ser muito mais do que uma simples forma de estocagem. Os nossos resultados sugerem que o polímero não é apenas um estoque energético, mas sim pode se comportar como um grande regulador do funcionamento da célula bacteriana como um todo. Para confirmar essa hipótese maiores investigações devem ser realizadas.

7 CONCLUSÕES

- Os grânulos de PHB de *H. seropedicae* apresentam várias proteínas associadas à sua estrutura;
- Outras proteínas ainda não relatadas foram encontradas associadas ao grânulo de PHB como: aconitase, proteínas hipotéticas (Hsero_3471 e Hsero_4241) e porinas;
- Mutantes para os genes *phaP1*, *phaP2*, *phbC1* e duplo mutante *phaP1/phaP2* foram obtidos;
- A segunda fasina é expressa no mutante TP1 e pode substituir PhaP1, mesmo que parcialmente;
- Uma nova fasina foi identificada em *H. seropedicae* (PhaP3), sendo a mesma expressa na ausência de PhaP1, e capaz de se ligar ao PHB;
- Análise de expressão indica que a expressão do gene *phaP1* é dependente da produção de PHB;
- Análise de expressão indica que a expressão do gene *phaP2* é dependente da produção de PHB e só ocorre no mutante TP1;
- Mutante TC1 não produz grandes quantidades de polímero;

8 REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, E. W.; MYERS, D. J. LIPMAN. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDERSON, A. J; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**. v. 54, p. 450–472, 1990.
- ANDRADY, A. L.; NEAL, M. A. Applications and society benefits of plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 364, p. 1977-1984, 2009.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 3 ed. Oxford: Benjamin Cummings, 1997, 640 p.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**. v. 56, p.365, 1984.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a new root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.36, p.86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov., and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, p. 802–810, 1996.
- BANKI, M. R.; GERNGROSS, T. U.; WOOD, D. W. Novel and economical purification of recombinant proteins: intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. **Protein Science**. v. 14, p. 1387–1395, 2005.

- BEINERT, H; KENNEDY, M. C. Aconitase, a two-faced protein: Enzyme and iron regulatory factor. **The FASEB journal**. v. 15, p. 1442–1449, 1993.
- BEINERT, H; KENNEDY, M. C; STOUT, D. C. Aconitase as Iron–Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein. **Chemical Reviews**. v. 96, p. 2335–2374, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**. v. 41, pp. 77-93, 1990.
- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**. v. 65, p. 127-161, 1998.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends Biotechnology** v. 5, p. 246–250, 1987
- CARTER, I. S.; DAWES, E. A. Effect of oxygen concentration and growth rate on glucose metabolism, poly-p-hydroxy-butyrate biosynthesis and respiration of *Azotobacter beijerinckii*. **Journal of General Microbiology**. v. 110, p. 393-400, 1979.
- CATALÁN, A. I.; FERREIRA, F.; GILL, P. R.; BATISTA, S. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 1352-1357, 2007.
- CHAVES, D. F. S. **Análise e identificação de proteínas celulares e proteínas secretadas por *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 2008. Tese (doutorado em Ciências-bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

- CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 51, p. 13-21, 1999.
- CHOU, M. E.; YANG, M. K. Analyses of binding sequences of the PhaR protein of *Rhodobacter sphaeroides* FJ1. **FEMS Microbiology Letters**. v. 302, p. 138-143, 2010.
- CHOW, M.E.; CHANG, W.T; CHANG, Y. C.; YANG, M. K. Expression of four *pha* genes involved in poly- β -hydroxybutyrate production and accumulation in *Rhodobacter sphaeroides* FJ1. **Molecular Genetics and Genomics**. v. 282, p. 97-106, 2009.
- DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**. v. 14, p. 135-266, 1973.
- DE EUGENIO, L. I.; GARCIA, P; LUENGO, J. M; SANZ, J. M; ROMAN, J.S; GARCIA J. L; PRIETO, M.A. Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442: characterization of a paradigmatic enzyme. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282, p. 4951-4962, 2007.
- DENNIS, D; LIEBIG, C; HOLLEY, T; THOMAS, K. S; KHOSLA, A; WILSON, D; AUGUSTINE, B. Preliminary analysis of polyhydroxyalkanoate inclusions using atomic force microscopy. **FEMS Microbiology Letters**. v. 226, p. 113-119, 2003.
- DENNIS, D; SEIN, V; MARTINEZ, E; AUGUSTINE, B. PhaP Is Involved in the Formation of a Network on the Surface of Polyhydroxyalkanoate Inclusions in *Cupriavidus necator* H16. **Journal of Bacteriology**. v. 190, p. 555-563, 2008.
- DERETIC, V.; HIBLER, N. S.; HOLT, S. C. Immunocytochemical analysis of AlgP (Hp1), a histone-like element participating in control of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**. v. 174, p. 824-831, 1992.

- DERETIC, V.; KONYECSNI, W. M. A procaryotic regulatory factor with a histone H1-like carboxy-terminal domain: clonal variation of repeats within algP, a gene involved in regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**. v. 172, p. 5544–5554, 1990.
- DOUDOROFF, M.; STAINER, R.Y. Role of poly- β -hydroxybutyric acid in the assimilation of organic carbon by bacteria. **Nature**. v. 183, p. 1440-1442, 1959.
- DRLICA, K.; ROUVIERE-YANIV, J. Histone-like proteins of bacteria. **Microbiology Reviews**. v. 51, p. 301–319, 1987.
- ELLAR, D.; LUNDGREN, D. G. Morphology of poly-3-hydroxybutyrate granules. **Journal of Molecular Biology** v. 35, p. 489-502, 1968
- ELSHOURBAGY, N. A; NEAR, J. C; KMETZ, P. J; WELLS, T. N; GROOT, P. H; SAXTY, B. A; HUGHES, S. A; FRANKLIN, M; GLOGER, I. S. Cloning and expression of a human ATP-citrate lyase cDNA. **European Journal of Biochemistry**. v. 204, p. 491–499, 1992.
- FINN, R. D., MISTRY, J.; TATE, J.; COGGILL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J. E.; GAVIN, O. L.; GUNASEKARAN, P.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E.L.; EDDY, S. R.; BATEMAN A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res**. v. 38, p. 211-222, 2010.
- FLINT, D. H.; ALLEN, R. M. Iron–Sulfur Proteins with Nonredox Functions. **Chemical Reviews**. v. 96, p. 2315–2334, 1996.
- FORSYTH, W. G. C; HAYWARD, A. C; ROBERTS, J. B. Occurrence of Poly- β -hydroxybutyric acid in Aerobic Gram-Negative bacteria. **Nature**. v. 182, p. 800-801, 1958.
- FRANCO, I. S.; MOTA, L. J.; SOARES, C. M.; DE SÁ-NOGUEIRA, I. Functional domains of the *Bacillus subtilis* transcription factor AraR and identification of amino acids important for nucleoprotein complex assembly and effector binding. **Journal of Bacteriology**. v. 188, p. 3024–3036, 2006.
- FULLER, R.C.; O'DONNELL, J.P.; SAULNIER, J.; REDLINGER, T.E.; FOSTER, J.; LENS, R.W. The supramolecular architecture of the

- polyhydroxyalkanoate inclusions in *Pseudomonas oleovorans*, **FEMS Microbiology Reviews**. v. 103 p.279-288, 1992.
- GALÁN, B; DINJASKI, N; MAESTRO, B; DE EUGENIO, L. I; ESCAPA, I. F; SANZ, J. M; GARCIA, J. L; PRIETO, M. A. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. **Molecular Microbiology**. v. 79, p. 402-418, 2011.
- GERNGROS, T. U. REILLY, P.; STUBBE, J.; SINSKEY, J.; PEOPLES, O. Immunocytochemical Analysis of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) Synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: Localization of the Synthase Enzyme at the Surface of PHB Granules. **Journal of Bacteriology**. v. 175, p. 5289- 5293, 1993.
- GREEN, J; PAGET, M. S. Bacterial redox sensors. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 954-966, 2004.
- GRIEBEL, R.; SMITH, Z.; MERRICK, J. M. Metabolism of Poly- β -hydroxybutyrate. I. Purification, Composition, and Properties of Native Poly-P-hydroxybutyrate Granules from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry**. v. 7, p. 3676-3681, 1968.
- GROTHER, E. MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 25, p. 132-141, 1999.
- GUPTA, P; MISHRA, S; CHAUDHURI, T. K. Reduced stability and enhanced surface hydrophobicity drive the binding of apo-aconitase with GroEL during chaperone assisted refolding. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 42, p. 683-692, 2010.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; REDDY, P.M.; LADHA, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**. v. 154, p. 131-145, 2002.
- HAN, M.-J.; YOON, S. S.; LEE, S. Y. Proteome analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* producing poly(3-hydroxybutyrate). **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 301–308, 2001.

- HANDRICK, R; REINHARDT, S; JENDROSSEK, D. 2000. Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. **Journal of Bacteriology**. v.182, p. 5916–5918, 2000.
- HOLMES, P. A. Applications of PHB- a microbially produced biodegradable thermoplastics. **Physics in Technology**. v. 16, p. 32-36, 1985.
- HOROWITZ, D. M.; SANDERS, J. K. M.. Biomimetic, amorphous granules of polyhydroxybutyrate: composition, mobility, and stabilization in vitro by proteins. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 115–123, 1995.
- HUIJBERTS, G.N.M; VAN DER WAL, H; WILKINSON, C; EGGINK, G. Gas-chromatographic analysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria. **Biotechnology Techniques**. v. 8, p. 187-192, 1994.
- JACKSON, F. A.; DAWES, E. A. Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly-,hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. **Journal of General Microbiology**. v. 97, p. 303-312, 1976.
- JAMES, E. K., P. GYANESHWAR, P. N. MATHAN, W. L. BARRAQUIO, P. M. REDDY, P. P. IANNETTA, F. L. OLIVARES; J. K. LADHA. 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interact.** v. 15, p. 894–906, 2002.
- JENDROSSEK, D. Fluorescence Microscopical Investigation of Poly(3-hydroxybutyrate) Granule Formation in Bacteria. **Biomacromolecules**. v. 6, p. 598-603, 2005.
- JENDROSSEK, D.; SELCHOW, O.; HOPPERT, M. Poly(3-Hydroxybutyrate) Granules at the Early Stages of Formation Are Localized Close to the Cytoplasmic Membrane in *Caryophanon latum*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, p. 586-593, 2007.
- JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of Molecular Biology**. v. 292, p. 195-202, 1999.

- KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y.; CASTRO-SOWINSKI, S., Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Critical Reviews in Microbiology**. v.31, p.55-67, 2005.
- KADOWAKI, M. A. S; MULLER-SANTOS, M; REGO, F. G. M; SOUZA, E. S; YATES, M. G; MONTEIRO, R. A; PEDROSA, F. O; CHUBATSU, L. S; STEFFENS, M. B. R; Identification and characterization of PhbF: A DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **BMC Microbiology**. v. 11, p. 1-9, 2011.
- KONING, G. J. M.; MAXWELL, I. A. Biosynthesis of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate: an emulsion polymerization. **Journal of Environmental Polymer Degradation**. v. 1, p. 223-226, 1993.
- KUCHTA, K.; CHI, L.; FUCHS, H.; PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Studies on the Influence of Phasins on Accumulation and Degradation of PHB and Nanostructure of PHB Granules in *Ralstonia eutropha* H16. **Biomacromolecules**. v. 8, p. 657-662. 2007.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.
- LAUZIER, C.; REVOL, J. F.; MARCHESSAULT, R. H. Topotactic crystallization of isolated poly(β -hydroxybutyrate) granules from *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 103, p. 299-310, 1992.
- LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 49, p. 1-14, 1996.
- LEVINE HB, WOLOCHOW H. Occurrence of poly-beta-hydroxybutyrate in *Pseudomonas pseudomallei*. **Journal of Bacteriology**. v. 79, p. 305–306, 1960.
- LIEBERGESELL, M.; STEINBÜCHEL, A. Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. **FEMS Microbiological Letters**. v. 99, p. 227–232, 1992.

- LUNDGREN, D. G.; PFISTER, R. M.; MERRICK, J. M. Structure of Poly- β -hydroxybutyric Acid Granules. **Journal of General Microbiology**. v. 34, p. 441-446, 1964.
- MACRAE, R. M; WILKINSON, J.F. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspension of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. **Journal of General Microbiology**. v. 19, p. 210-222, 1958.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiological Molecular Biology Reviews**. v. 63, p. 21-53, 1999.
- MAEHARA, A.; DOI, Y.; NISHIYAMA, T.; TAKAGI, Y.; UEDA, S.; NAKANO, H.; YAMANE, T. PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans phaP* expression in vitro. **FEMS Microbiology Letters**. v. 200, p. 9-15, 2001.
- MAEHARA, A.; UEDA, S.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Analyses of a Polyhydroxyalkanoic Acid Granule-Associated 16-Kilodalton Protein and Its Putative Regulator in the *pha* Locus of *Paracoccus denitrificans*. **Journal of Bacteriology**. v. 181, p. 2914- 2921, 1999.
- MATSUI, M.; FOWLER, J.H.; WALLING, L. L. 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. **Journal of Biological Chemistry**. v. 387, p.1535-1544, 2006.
- MATSUMOTO, K.; MATSUSAKI, H.; TAGUCHI, K.; SEKI, M.; DOI, Y. Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas* sp 61-3. **Biomacromolecules** v. 3, p. 787-792, 2002.
- MAYER, F. Structural aspects of poly- β -hydroxybutyrate granules. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 103, p. 265- 268, 1992.
- MAYER, F.; HOPPERT, M. Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies and implications for models describing the molecular architecture of this layer. **Journal of Basic Microbiology**. v. 37, p. 45-52, 1997.

- MEDVEDKIN, V. N.; PERMYAKOV, E. A.; KLIMENKO, L. V.; MITIN, Y. V.; MATSUSHIMA, N.; NAKAYAMA, S.; KRETSINGER, R. H. Interactions of (Ala*Ala*Lys*Pro)_n and (Lys*Lys*Ser*Pro)_n with DNA. Proposed coiled- coil structure of AlgR3 and AlgP from *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein Engineering**. v. 8, p. 63–70, 1995.
- MERRICK, J. M. Effect of Polymyxin B, Tyrocidine, Gramicidin D, and Other Antibiotics on the Enzymatic Hydrolysis of Poly-β-Hydroxybutyrate. **Journal of Bacteriology**. v. 90, p. 965-969, 1965.
- MERRICK, J. M.; DOUDOROFF, M. Depolymerization Of Poly-B-Hydroxybutyrate By An Intracellular Enzyme System. **Journal of Bacteriology**. v. 88, p. 60- 71, 1964.
- MOSKOWITZ, G. J.; MERRICK, J. M. Metabolism of poly-3-hydroxybutyrate. II. Enzymatic synthesis of D-(-)-P- hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. **Biochemistry**. v. 8, p. 2748-2755, 1969.
- NEUMAN, LIV.; SPINOZZI, F.; SINIBALDI, R.; RUSTICHELLI, F.; PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Binding of the Major Phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to Poly(3-Hydroxybutyrate) Granules. **Journal of Bacteriology**. v. 190, p. 2911-2919, 2008.
- NISHIMURA, T.; SAITO, T.; TOMITA, K. Purification and properties of 1-ketothiolase from *Zoogloea ramigera*. **Archives of Microbiology**. v. 116, p. 21-27, 1978.
- OEDING, V.; SCHLEGEL, H. G. 3-Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate metabolism. **Biochemichal Journal**. v. 134, p. 239-248, 1973.
- PAGE, J.W; KNOSP, O. Hyperproduction of Poly-β-Hydroxybutyrate during Exponential Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 55, p.1334-1339, 1989.
- PEDROSA, F. O; MONTEIRO, R. A; WASSEM, R; CRUZ, L; AYUB, R. A; COLAUTO, N. B; FERNANDEZ, M. A; FUNGARO, M. H; GRISARD, E. C; HUNGRIA, M; *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a

- specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**. v. 7, p. 1-10, 2011.
- PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. **FEMS Microbiology Letters**. v. 23, p. 95-101, 1984.
- PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 264, p. 15293-15297, 1989.
- PERKINS, N. D.; PAPPIN, J. C. D.; CREASY, M. D.; COTTRELL, S. J. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**. v. 20, p. 3551-3567, 1999.
- PFEIFFER, D; JENDROSSEK, D. Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha*. **Microbiology**. v. 157, p. 2795-2807, 2011b.
- PFEIFFER, D; WAHL, A; JENDROSSEK, D. Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. **Molecular Microbiology**. v. 82, p. 936-951, 2011a.
- PIEPER-FURST, U.; MADKOUR, M.H.; M.H.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Identification of the Region of a 14-Kilodalton Protein of *Rhodococcus ruber* That Is Responsible for the Binding of This Phasin to Polyhydroxyalkanoic Acid Granules. **Journal of Bacteriology**. v. 177, p. 2513-2523, 1995.
- PIEPER-FURST, U.; MADKOUR, M.H.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Purification and Characterization of a 14-Kilodalton Protein That Is Bound to the Surface of Polyhydroxyalkanoic Acid Granules in *Rhodococcus ruber*. **Journal of Bacteriology**. v. 176, p. 4328- 4337, 1994.
- PIEPER-FURST, U.; STEINBÜCHEL, A. Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the Gram-

- positive bacterium *Rhodococcus ruber*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 96, p. 73- 80, 1992.
- PIETRO, M. A.; BÜHLER, B.; JUNG, K.; WITHOLT, B.; KESSLER, B. PhaF, a Polyhydroxyalkanoate-Granule-Associated Protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 Involved in the Regulatory Expression System for *pha* Genes. **Journal of Bacteriology**. v. 181, p. 858-868, 1999.
- POHLMANN, A.; FRICKE, W. F.; REINECKE, F.; et al. Genome sequence of the bioplastic- producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature Biotechnology**. v. 24, p. 1257-1262, 2006.
- PÖTTER, M.; MADKOUR, M. H.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**. v.148, p. 2413-2426, 2002.
- PÖTTER, M.; MULLER, H.; REINECKE, F.; WIECZOREK, R.; FRICKE, F.; BOWIEN, B.; FRIEDERICH, B.; STEINBÜCHEL, A. The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. **Microbiology**. v. 150, p. 2301-2311, 2004.
- PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. **Biomacromolecules**. v. 6, p. 552-560, 2005.
- REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**. v. 87, p. 137-146, 2003.
- REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 25(1-3), p. 3-19, 1999.
- REN, Q., G. de ROO, K. RUTH, B. WITHOLT, M. ZINN, and L. THONY-MEYER. Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? **Biomacromolecules**. v. 10, p. 916-922, 2009.

- REPASKE, R.; REPASKE A. C. Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 32, p. 585-591, 1976.
- RIGALI, S.; DEROUAUX, A.; GIANNOTTA, F.; DUSART, J. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. **Journal of Biological Chemistry**. v. 227, p. 12507–12515, 2002.
- RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**., v. 45, p. 39-47, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. 1989.
- SCHAFER, A; TAUCH, A; JAGER, W; KALINOWSKI, J; THIERBACH, G; PUHLER, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**. v. 145, p. 69-73, 1994.
- SCHLEGEL, H. G., G. GOTTSCHALK, and R. VON BARTHA. 1961. Formation and utilization of poly-3-hydroxybutyric acid by *Knallgas* bacteria (*Hydrogenomonas*). **Nature**. v. 191, p. 463–465, 1961.
- SCHLEGEL, H.G; GOTTSCHALK, G; BARTHA V. R. Formation and utilization of poly-beta-hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). **Nature**. v. 191, p. 463-465, 1967.
- SCHUBERT, A.; STEINBÜCHEL, A.; SCHELEGEL, H. G. Cloning of *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 170, p. 5837-5847, 1988.
- SCHWAB, Stefan. **Identificação e caracterização de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amônio.**

- Curitiba, 2006. Tese (doutorado em Ciências-Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. Poly-b-hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochemical Journal**. v. 125, p. 55–66, 1971.
- SENIOR, P.J.; DAWES, E.A. The regulation of poly-b-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochemical Journal**. v. 134, p. 225–238, 1973.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nature Biotechnology**. v. 1, p. 784-791, 1983.
- SLATER, S. C.; VOIGE, W. H.; DENNIS, D. E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **Journal of Bacteriology**. v. 170, p. 4431-4436, 1988.
- SONNLEITNER, B.; HEINZLE, E.; BRAUNEGG, G.; LAFFERTY, R. M. Formal kinetics of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) production in *Alcaligenes eutrophus* H 16 and *Mycoplana rubra* R 14 with respect to the dissolved oxygen tension in ammonium- limited batch cultures. **European Journal of Applied Microbiology**. v. 7, p. 1-10, 1979.
- SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**. v. 146, p. 1407-1418, 2000.
- SPAINK, H. P.; OKKER, R. J. H.; WIJFFELMAN, C. A.; PEES, E.; LUGTENBERGER, B. J. J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. **Plant Molecular Biology**. v. 9, p. 27-39, 1987.
- STEINBÜCHEL, A.; AERTS, K.; BABEL, W.; FOLLNER, C.; LIEBERGESELL, M.; MADKOUR, M. H.; MAYER, F.; PIEPER-FURST, U.; , PRIES, A.; VALENTIN, H. E.; WIECZOREK, R. Considerations on the structure and

- biochemistry of bacterial poly- hydroxyalkanoic acid inclusions. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 1, p. 94-105, 1995.
- STEINBÜCHEL, A.; FUCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**. v. 16, p. 419–427, 1998.
- STEINBÜCHEL, A.; HUSTED, E.; LIEBERGESELL, M.; PIEPER, U.; TIMM, A.; VALENTIN, H. Molecular basis for biosynthesis and accumulation for polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 103, p. 217-230, 1992.
- STEINBÜCHEL, A.; WIECZOREK, R.; KRUGER, N. PHA biosynthesis, its regulation and application of C1-utilizing microorganisms for polyester production. In *Microbial Growth on Compounds*, pp. 237±244. Edited by M. E. Lidstrom & F. R. Tabita. Dordrecht : Kluwer. 1996.
- STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Excretion of pyruvate by mutants of *Alcaligenes eutrophus*, which are impaired in the accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) (PHB), under conditions permitting synthesis of PHB. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 31, p. 168–175, 1989.
- STUBBE, J.; TIAN, J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. **Natural Product Reports**. v. 20, p. 445–457, 2003.
- SUN, T.; HAYAKAWA, K.; BATEMAN, K. S.; FRASER, M. E. Identification of the citrate-binding site of human ATP-citrate lyase using X-ray crystallography. **Journal of Biological Chemistry**. v. 285, p. 27418–27428, 2010.
- TESSMER, N.; KONIG, S.; MALKUS, U.; REICHELT, R.; PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, S. Heat-shock protein HspA mimics the function of phasins sensu stricto in recombinant strains of *Escherichia coli* accumulating polythioesters or polyhydroxyalkanoates. **Microbiology**. v. 153, p. 366-374, 2007.
- THOMPSON, R. C.; MOORE, C. J.; VOM SAAL, F. S.; SWAN, S. H. Plastics, the environmental and human death: current consensus and future trends. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 364, p. 2153-2166, 2009.

- TIAN, J.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. **Journal of Bacteriology**. v. 187, p. 3814-3824, 2005.
- TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **European Journal of Biochemistry**. v. 209, p. 15–30, 1992..
- UCHINO, K; SAITO, T; GEBAUER, B; JENDROSSEK, D. Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. **Journal of Bacteriology**. v. 189, p. 8250-8256, 2007.
- WALTERMANN, M; STEINBÜCHEL, A. Neutral Lipid Bodies in Prokaryotes: Recent Insights into Structure, Formation, and Relationship to Eukaryotic Lipid Depots. **Journal of Bacteriology**. v. 187, p. 3607-3619, 2005.
- WARD, A. C.; ROWLEY, B. I.; DAWES, E. A. Effect of oxygen and nitrogen limitation on poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in ammonium-grown *Azotobacter beijerinckii*. **Journal of General Microbiology**. v. 102, p. 61-68, 1977.
- WIECZOREK, R.; PRIES, A.; STEINBÜCHEL, A.; MAYER, F. Analysis of a 24-Kilodalton Protein Associated with the Polyhydroxyalkanoic Acid Granules in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**. v. 177, p. 2425- 2535, 1995.
- YAMADA, M.; YAMASHITA, K.; WAKUDA, A.; ICHIMURA, K.; MAEHARA, A.; MAEDA, M.; TAGUCHI, S. Autoregulator Protein PhaR for Biosynthesis of Polyhydroxybutyrate [P(3HB)] Possibly Has Two Separate Domains That Bind to the Target DNA and P(3HB): Functional Mapping of Amino Acid Residues Responsible for DNA Binding. **Journal of Bacteriology**. v. 189, p. 1118-1127, 2007.
- YAMASHITA, K.; YAMADA, M.; NUMATA, K.; TAGUCHI, S. Nonspecific hydrophobic interactions of a repressor protein, PhaR, with poly[(R)-3-

hydroxybutyrate] film studied with a quartz crystal microbalance. **Biomacromolecules**. v. 8, p. 2449–2454, 2006.

YORK, G. M.; JUNKER, B. H.; STUBBE, J. A.; SINSKEY, A. J. Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 4217-4226, 2001b.

YORK, G. M.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes poly-hydroxybutyrate production. **Journal of Bacteriology**. v. 184, p. 59-66, 2002.

YORK, G.M.; STUBBE, J.; SINSKEY, A.J. New Insight into the Role of the PhaP Phasin of *Ralstonia eutropha* in Promoting Synthesis of Polyhydroxybutyrate. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 2394-2397, 2001a.